

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



## SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

### Dottorato di Ricerca in Scienze dell'Alimentazione e della Nutrizione

#### XXVII Ciclo

**Coordinatore: Prof. F. Contaldo**

#### **Tesi di Dottorato:**

*Approccio integrato allo studio dei composti bioattivi di origine vegetale:  
dall'epidemiologia nutrizionale allo sviluppo di prototipi di alimenti  
funzionali per la prevenzione e il trattamento delle patologie cardio-  
metaboliche*

#### **TUTOR**

Prof.ssa Olga Vaccaro

#### **CANDIDATA**

Dott.ssa Marilena Vitale

## **Indice**

1. Introduzione	<b>2</b>
2. Composti bioattivi di origine vegetale	
2.1 Definizione	<b>3</b>
2.2 I Polifenoli: definizione, struttura e classificazione	<b>3</b>
2.3 La fibra: definizione, struttura e classificazione	<b>13</b>
3. Assunzione di composti bioattivi di origine vegetale	<b>14</b>
3.1 Dati dalla letteratura	<b>14</b>
4. Effetti metabolici derivanti dal consumo di composti bioattivi di origine vegetale	<b>17</b>
4.1 Dati dalla letteratura	<b>17</b>
5. La Dieta Mediterranea: un modello per promuovere il consumo di composti bioattivi di origine vegetale	<b>22</b>
6. Linea di Ricerca	<b>25</b>
7. Studi Sperimentali	
7.1 Tematica 1: Valutazione degli effetti di diete arricchite in polifenoli sul profilo di rischio cardiovascolare: Progetto ETHERPATHS	<b>26</b>
7.2 Tematica 2: Valutazione delle abitudini alimentari in pazienti con diabete tipo 2 e relazione con lo stato di salute (controllo glicemico, profilo di rischio cardiovascolare, infiammazione subclinica): Progetto TOSCA.IT	<b>50</b>
7.3 Tematica 3: Dieta Mediterranea: sviluppo di un questionario di frequenza semplificato e screening su popolazione per la valutazione dei fattori che influiscono sull'adesione a tale modello: Progetto MEDIQUEST	<b>61</b>
8. Sviluppo di prototipi di alimenti funzionali arricchiti in composti bioattivi di origine vegetale: Progetto PRIN	<b>73</b>
9. Bibliografia	<b>79</b>
10. Pubblicazioni	<b>97</b>

## **1. Introduzione**

Negli ultimi anni, l'interesse per i composti bioattivi di origine vegetale è aumentato in modo esponenziale perché si è compreso come essi possono influenzare in modo benefico la salute umana<sup>1-2</sup>.

I risultati di diversi studi epidemiologici e di intervento indicano che il consumo di alimenti o bevande ricchi in composti bioattivi di origine vegetale, quali cereali integrali, legumi, frutta, vegetali, noci, caffè e tè, è strettamente associato con una riduzione del rischio di sviluppo di diabete, malattie cardiovascolari e alcuni tipi di neoplasie<sup>3-5</sup>. Invece, il consumo di bevande zuccherate, carne rossa, grassi saturi e trans, si associa ad un aumento di tale rischio<sup>6-7</sup>.

È anche noto che la combinazione di questi alimenti in un modello dietetico come la "Dieta Mediterranea" è ancora più efficace nella prevenzione di tali patologie rispetto al consumo dei singoli alimenti<sup>8-9</sup>. Infatti, la sinergia tra gli alimenti che caratterizzano la Dieta Mediterranea massimizza l'effetto di tutti i meccanismi coinvolti nella prevenzione delle malattie metaboliche, come la riduzione del peso corporeo, il miglioramento della sensibilità insulinica, la riduzione dello stress ossidativo e l'infiammazione subclinica<sup>1</sup>.

## **2. Composti bioattivi di origine vegetale**

### *2.1 Definizione*

I composti bioattivi di origine vegetale rappresentano una grande varietà di sostanze, comunemente assunte con la dieta, in grado di modulare numerose attività biologiche e importanti funzioni dell'organismo; pertanto, possono influenzare positivamente la salute e contribuire alla prevenzione di malattie. Le attività da essi esercitate sono molteplici: attività antiossidante e antinfiammatoria, modulazione degli enzimi di detossificazione, stimolazione del sistema immunitario, modulazione del metabolismo ormonale, attività antibatterica e antivirale, attività antiproliferativa e proapoptotica, etc.<sup>10-11</sup>.

Tuttavia, gli studi che permettono di evidenziarne il ruolo sulla salute non sono ancora conclusivi e risultano generalmente focalizzati su composti specifici e sui loro effetti su un numero limitato di marcatori.

I principali composti bioattivi di origine vegetale presenti nella nostra alimentazione sono i *Polifenoli* e la *Fibra*.

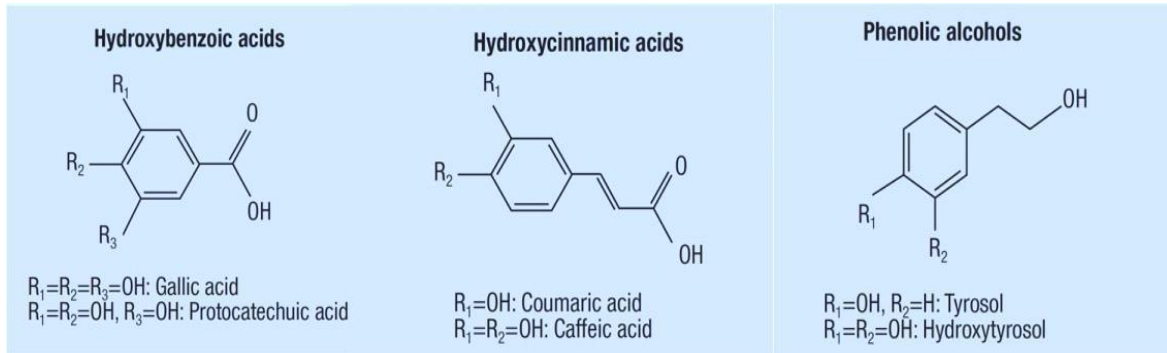
### *2.2 I polifenoli: definizione, struttura e classificazione*

I polifenoli sono i composti bioattivi di origine vegetale più abbondanti nella nostra alimentazione; sono largamente diffusi nella frutta, verdura, cereali, olive, legumi, cioccolata ed in alcune bevande come il tè, caffè e vino. Generalmente influenzano la qualità, la palatabilità e la stabilità dell'alimento agendo come aromatizzanti, coloranti e antiossidanti<sup>12</sup>.

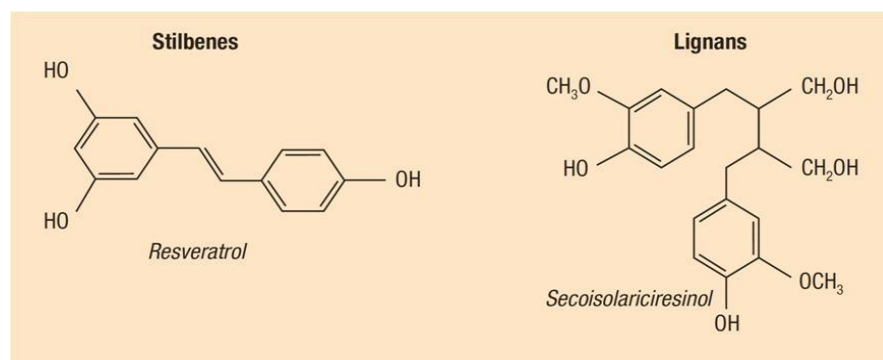
Il termine "*polifenoli*" include numerose classi di composti aventi una struttura chimica comune; sono derivati del benzene con uno o più gruppi idrossilici associati all'anello fenolico. Pertanto, a seconda del numero di anelli fenolici che essi

contengono e degli elementi strutturali che legano questi anelli tra loro, i polifenoli possono essere distinti in:

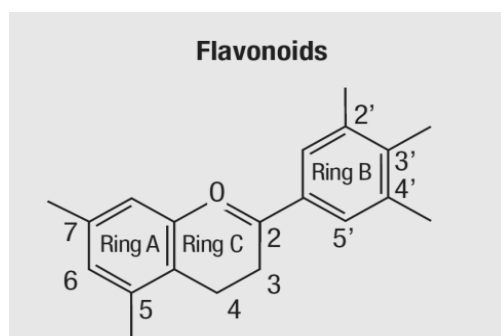
- Molecole con **un solo** anello benzenico ed un gruppo funzionale terminale carbossilico (**acidi fenolici**) o ossidrilico (**alcoli fenolici**)



- Molecole con **due** anelli benzenici e struttura lineare (**stilbeni**) o ramificata (**lignani**)



- Molecole con **più** anelli benzenici (**flavonoidi**)



### 2.2.1 Acidi fenolici

Questi composti possono essere suddivisi in: *acidi idrossibenzoici* e *acidi idrossicinnamici*.

Gli *acidi idrossibenzoici*, come *l'acido gallico* e *l'acido protocatecuico*, si trovano in pochissimi vegetali commestibili per l'uomo, perciò sono di scarso interesse nutrizionale. Il loro contenuto è generalmente molto basso, fatta eccezione per le more (che ne contengono fino a 270 mg/kg di peso), le foglie di tè (che rappresentano una fonte importante di acido gallico:  $\leq 4,5$  g/kg), i lamponi (che contengono fino a 100 mg di acido protocatecuico/kg) e l'olio di oliva (la cui concentrazione di acido protocatecuico è di circa 0,22 mg/kg). Tuttavia, va considerato che le concentrazioni di acido protocatecuico in circolo potrebbero essere superiori alla quantità ingerita con gli alimenti, perché questo composto nell'uomo rappresenta il metabolita più importante delle antocianine, come la cianidina-3-glucoside.

Gli *acidi idrossicinnamici* comprendono soprattutto l'acido *cumarico*, *ferulico* e *caffeico*. Raramente si trovano in forma libera, generalmente sono legati a derivati glicosidici o ad esteri dell'acido chinico, schimico o tartarico. Gli acidi chinico e caffeico si combinano per formare *l'acido clorogenico*, che si trova in molti tipi di frutta e in alte concentrazioni nel caffè (una tazza può contenerne fino a 350 mg). *L'acido caffeico* è l'acido fenolico più abbondante, rappresentando tra il 75% e il 100% degli acidi idrossicinnamici totali contenuti nella maggior parte dei frutti: i kiwi contengono fino a 1 g di acido caffeico/kg del peso<sup>10;12</sup>. *L'acido ferulico* è l'acido fenolico più abbondante nei cereali: nei chicchi di grano è presente per lo 0,8-2 g/kg del peso secco, pari a circa il 90% dei polifenoli totali<sup>10;12</sup>.

### 2.2.2 Alcoli fenolici

Il *tirosolo* (4-idrossifeniletanolo) e l'*idrossitirosolo* (3,4-di-idrossifeniletanolo) sono alcoli fenolici contenuti nell'olio extravergine di oliva. La concentrazione media di alcoli fenolici totali nell'olio extravergine di oliva commerciale è di circa 180 mg/kg. Essa dipende dalla varietà delle olive, dal clima, dalla zona di crescita, dalla latitudine e dalla maturazione. Il *tirosolo* è presente anche nei vini bianchi e rossi, e nella birra, mentre l'*idrossitirosolo* si trova solo nel vino rosso ed è prodotto anche in vivo dopo l'ingestione di quest'ultimo.

### 2.2.3 Stilbeni

L'uomo, con la dieta, assume piccole quantità di *stilbeni*: il più rappresentato è il *resveratrolo*, presente nelle forme isomeriche *cis* e *trans*, di cui quest'ultima risulta essere la più stabile. E' prodotto nelle piante in risposta alle infezioni da agenti patogeni o in seguito a varie condizioni di stress. E' stato rilevato in più di 70 specie di piante, tra cui uva, frutti di bosco e arachidi. Abbonda nella buccia fresca delle uve rosse (50-100 g/kg di peso netto) e perciò raggiunge concentrazioni relativamente alte nel vino rosso e nel succo d'uva. Il *resveratrolo* è assorbito maggiormente a livello del duodeno; studi condotti sui topi, utilizzando *resveratrolo* marcato, hanno rilevato, già dopo 3h dalla somministrazione, la presenza di questa molecola nel cervello, cuore, polmoni, milza e testicoli e dopo 6 ore la permanenza nel fegato e nei reni. Nel plasma, invece, la sua concentrazione è molto scarsa e di breve emivita.

Il *trans-resveratrolo* possiede diversi effetti benefici e può agire a diversi livelli come sui segnali cellulari, nei processi enzimatici, nell'apoptosi e sull'espressione genica<sup>13-15</sup>. È stata attribuita al *resveratrolo* la capacità di prevenire o rallentare la progressione di alcune malattie come il cancro, le malattie cardiovascolari, le malattie

neurodegenerative e di migliorare la resistenza allo stress ossidativo<sup>16</sup>. Essendo lipofilo, il *resveratrolo* si lega in maniera preferenziale alle lipoproteine HDL, LDL, VLDL proteggendole dalla ossidazione da metalli ionici e rimuovendo gli ioni rame sia dalle LDL che dalle pareti arteriose. E' trasportato nel circolo sanguigno legato prevalentemente alle LDL, sia come molecola integra sia come suoi metaboliti: *trans-resveratrolo-3-O-glucuronide*, *cis-resveratrolo-3-O-glucuronide* e *cis-resveratrolo-3-O-glucoside*<sup>17</sup>. E' stato dimostrato che circa il 75% di *trans-resveratrolo* assunto col vino rosso è assorbito per diffusione passiva e solo <1% è biodisponibile a livello epatico e intestinale. Il *trans-resveratrolo* può, inoltre, significativamente modulare una grande varietà di percorsi pro-infiammatori attraverso l'inibizione dell'attivazione dell'Nf-kB, della espressione delle molecole d'adesione e delle proteine della fase acuta<sup>18</sup>.

#### 2.2.4 Lignani

I *lignani* sono presenti in natura per lo più in forma libera, ed in minore quantità come derivati glicosidici. Il più noto è il *secoisolariciresinolo* presente nei semi di lino (3,7 g/kg di peso secco). La microflora intestinale metabolizza i *lignani* a *enterodiolo* e *enterolattone*; le concentrazioni nel plasma e nelle urine non rendono ragione delle basse quantità di *lignani* solitamente contenute nella dieta umana. Ciò lascia intendere che ci sono certamente altri *lignani* di origine vegetale che fungono da precursori di *enterodiolo* e *enterolattone*, ma non ancora identificati<sup>10;12</sup>.

#### 2.2.5 Flavonoidi

I flavonoidi sono largamente distribuiti nel regno vegetale e vengono normalmente assunti tramite cereali, frutta, verdura, legumi nonché con le più comuni bevande quali tè, vino e birra. Sono sintetizzati dall'enzima Calcone Sintetasi, a partire da tre



molecole di Malonil-CoA e una molecola di 4-Cumaroil-CoA. Il *calcone*, oltre a rappresentare una classe di flavonoidi, è il primo polifenolo sintetizzato, da cui derivano tutti gli altri. La biosintesi dei vari flavonoidi, oltre che dalla genetica della pianta e dal suo ciclo biologico, è regolata da numerosi fattori esterni come la luce, la temperatura, la composizione del terreno, i danni meccanici, l'attacco di parassiti, ecc. Negli ultimi anni sono state attribuite ai flavonoidi diverse funzioni quali cattura dei radicali dell'ossigeno, azione anticancro, antipertensiva, antibatterica, antibiotica e antiallergica<sup>19</sup>. Appartengono alla classe dei flavonoidi i *flavoni*, *flavonoli*, *flavanoni*, *flavan-3-oli*, *isoflavoni*, *antocianine*.

*Flavoni*: Possiedono un doppio legame tra le posizioni C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> e sono i flavonoidi meno comuni. Prezzemolo e sedano rappresentano le uniche fonti alimentari di flavoni, come *apigenina*. La buccia dei frutti contiene grandi quantità di flavoni polimetossilati: ad esempio nella buccia di mandarino il loro contenuto arriva fino a 6,5 g/L di olio essenziale di tale frutto<sup>10; 12</sup>.

*Flavonoli*: Presentano un doppio legame tra le posizioni C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> e un ossidrile in C<sub>3</sub>. Essi rappresentano i flavonoidi più abbondanti negli alimenti, di cui la *quercetina* risulta il composto più rappresentativo. Le principali fonti di flavonoli sono le cipolle (fino a 1,2 g/kg di peso fresco), il cavolo riccio, i porri, i broccoli ed i mirtilli. Il tè ed il vino rosso possono contenere fino a 45 e 30 mg di flavonoli/L, rispettivamente. E' importante notare che la biosintesi dei flavonoli è stimolata dalla luce; infatti, essi si accumulano nel tessuto esterno della frutta. Possono, inoltre, esistere differenze di concentrazione di flavonoli tra frutti dello stesso albero e anche nelle diverse parti dello stesso frutto, a seconda dell'esposizione alla luce del sole<sup>10;12</sup>.

Flavanoni: Sono caratterizzati dalla presenza di una catena satura di tre atomi di carbonio e un atomo di ossigeno in C<sub>4</sub>. Sono generalmente glicosilati da un disaccaride in C<sub>7</sub>. I *flavanoni* sono presenti in alte concentrazioni negli agrumi, ma anche nei pomodori ed in alcune piante aromatiche come la menta. I principali sono la *naringenina* nel pompelmo, *l'esperidina* e la *narirutina* nelle arance, e *l'erioidictolo* nei limoni. Un succo d'arancia contiene circa 470-761 mg/L di *esperidina* e 20-86 mg/L di *narirutina*. La parte solida degli agrumi, in particolare la porzione spugnosa bianca (l'albedo) e le membrane che separano il frutto in segmenti, hanno un contenuto molto alto in *flavanoni*: questa è la ragione per cui il frutto intero può contenere fino a 5 volte più *flavanoni* di un bicchiere di succo d'arancia<sup>10;12</sup>.

Flavan-3-oli: Sono caratterizzati nell'anello C da tre atomi di carbonio saturi, un gruppo ossidrilico in C<sub>3</sub> e assenza dell'ossigeno in C<sub>4</sub>. Esistono in forma di monomeri (*catechine*) e di polimeri (*proantocianidine*). A differenza di altre classi di flavonoidi, questi non sono glicosilati negli alimenti, ma spesso si ritrovano in forma acilata.

Le *catechine* vengono classificate in *catechina*, *epicatechina*, *gallocatechina*, *epigallocatechina* e *l'epigallocatechin-gallato*. La *catechina* ed *epicatechina* si trovano in molti frutti come le albicocche (250 mg/kg del peso) e le ciliegie (250 mg/kg del peso) e nel vino rosso (fino a 300 mg/L). La *gallocatechina*, *epigallocatechina* e *epigallocatechin-gallato* abbondano nel tè verde (fino a 800 mg/L) e nel cioccolato (fino a 600 mg/L)<sup>10;12</sup>.

Le *proantocianidine*, note anche come tannini condensati, sono dimeri, oligomeri e polimeri delle catechine. E' molto difficile valutare il loro contenuto nei cibi, perché molto diverse per struttura e peso molecolare. Nelle mele da sidro, per esempio, il grado di polimerizzazione delle proantocianidine va da 4 a 11 monomeri. Sono

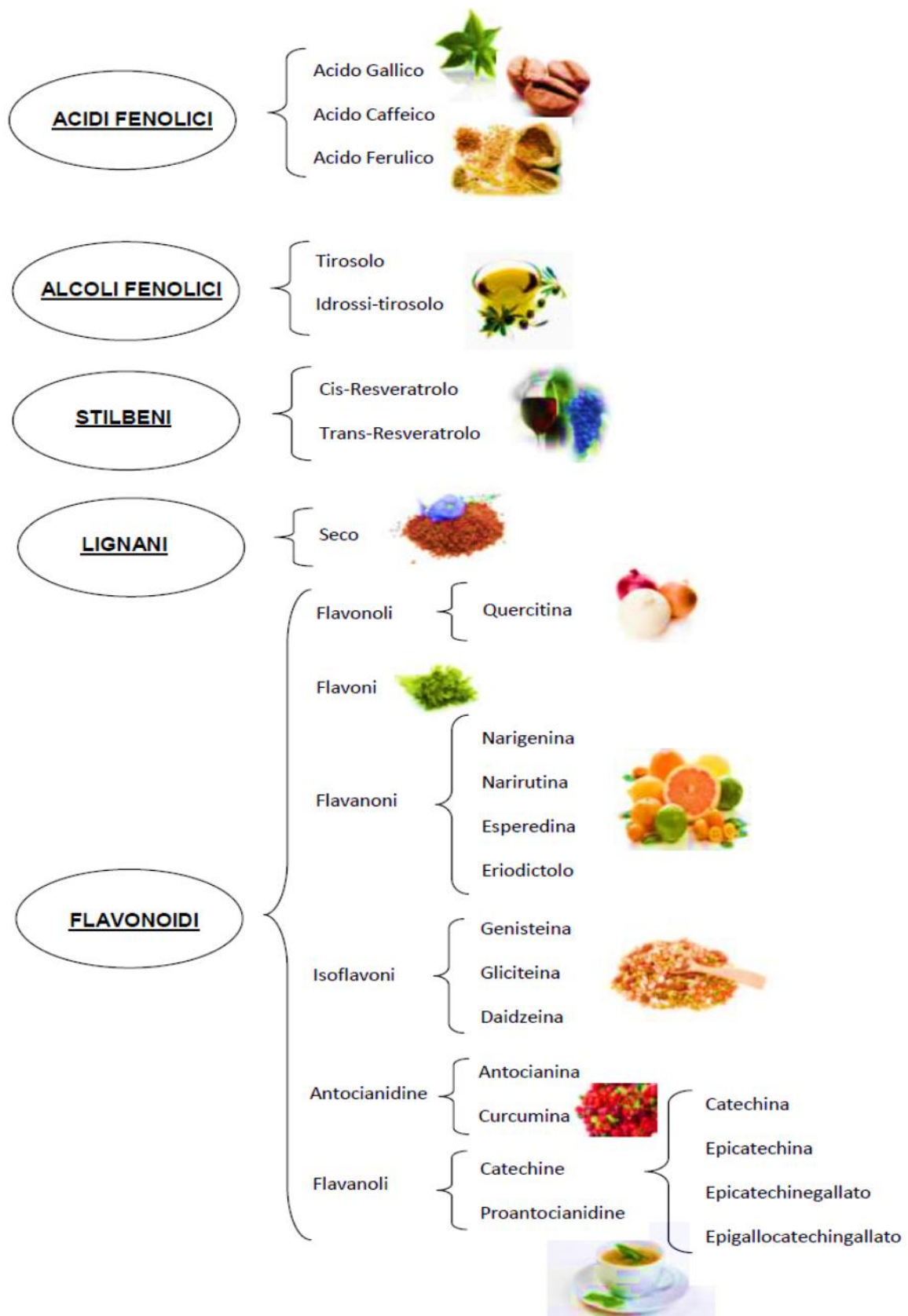
responsabili del carattere astringente della frutta (uva, mele, frutti di bosco, ecc) e di alcune bevande (vino, sidro, tè, birra ecc) e dell'amarezza del cioccolato. È importante notare che questa astringenza cambia nel corso della maturazione e spesso scompare quando il frutto raggiunge la maturazione.

Isoflavoni: Presentano la struttura base dell'1-2 difenil-propano. Hanno somiglianze strutturali con gli estrogeni, cioè gruppi ossidrilici in posizione C7 e C4, come la molecola di estradiolo. Possono legarsi ai recettori per gli estrogeni e sono quindi classificati come fitoestrogeni. Gli *isoflavoni* sono contenuti quasi esclusivamente nelle piante leguminose. La soia ed i suoi prodotti derivati rappresentano la principale fonte di *isoflavoni*, e contengono le tre molecole principali (*genisteina*, *daidzeina* e *gliciteina*) che si presentano come agliconi o, più spesso, in forme glucosio-coniugate. I germogli di soia contengono tra 140 e 1530 mg /kg in peso e il latte di soia può contenere tra i 12 e i 130 mg/L<sup>10;12</sup>.

Antocianine: Le *antocianine* sono pigmenti solubili in acqua, responsabili per la maggior parte dei colori rosso, blu e viola della frutta, verdura, fiori e altri tessuti o prodotti vegetali. Esse si presentano principalmente come glicosidi, in cui il residuo di zucchero è principalmente legato alla posizione 3 dell'anello C o alle posizioni 5 e 7 dell'anello A. Sebbene molto rara, la glicosilazione è stata osservata anche in posizione 3', 4' e 5' dell'anello B. Il residuo di zucchero può essere anche acilato da diversi acidi aromatici o alifatici: il più comune è l'*acido cinnamico*. Le *antocianine* sono ampiamente distribuite nell'alimentazione umana: sono presenti nel vino rosso (fino a 350 mg/L), in alcune varietà di cereali e in alcune verdure (cavoli, fagioli, cipolle, ravanelli), ma abbondano soprattutto nella frutta laddove il contenuto è

generalmente proporzionale all'intensità del colore ed al grado di maturazione; nel ribes nero e nelle more raggiunge valori fino a 2-4 g/kg. Le *antocianine* sono presenti soprattutto nella buccia della frutta, ad eccezione di alcuni frutti rossi (ciliegie e fragole) in cui sono presenti anche nella polpa<sup>10;12</sup>.

Concludendo, i polifenoli, per le loro caratteristiche chimiche, risultano così classificati (Figura 1):



**Figura 1. Classificazione dei polifenoli**

### 2.3 La fibra: definizione, struttura e classificazione

La FAO/WHO<sup>20</sup> definisce come fibra alimentare tutti i carboidrati aventi un grado di polimerizzazione superiore a 3 che non sono né digeriti né assorbiti nell'intestino tenue.

La *fibra* non è una sostanza singola, ma una miscela estremamente complessa di polisaccaridi diversi, quali cellulosa, emicellulose, lignina, pectine, gomme, mucillagini, galattomannani,  $\beta$ -glucani, polisaccaridi di alghe (agar e carragenine). Essa è convenzionalmente classificata in due categorie in relazione alla solubilità in acqua: *fibra insolubile* (cellulosa, parte delle emicellulose e lignina) e *fibra solubile* (pectine, gomme e mucillagini). L'effetto fisiologico principale connesso all'assunzione della *fibra insolubile* è il miglioramento della peristalsi intestinale, legato alla capacità di trattenere acqua, ed all'influenza sulla viscosità<sup>21</sup>. La *fibra solubile* ha molteplici funzioni: rappresenta un buon substrato per alcuni ceppi di batteri lattici e bifido-batteri, che sono benefici per la salute intestinale svolgendo, quindi, un'azione prebiotica; è in grado di controllare la risposta glicemica e di ridurre il colesterolo plasmatico<sup>22</sup>.

I risultati degli studi osservazionali e d'intervento nutrizionale mostrano che l'introduzione di fibra con gli alimenti è in relazione con la riduzione del rischio per importanti malattie cronico-degenerative, in particolare tumori al colon-retto, diabete e malattie cardiovascolari, nonché con l'aumento del senso di sazietà ed il miglioramento della funzionalità intestinale e dei disturbi ad essa associati (stipsi, diverticolosi).

### 3. Assunzione di composti bioattivi di origine vegetale

La stima della quantità di polifenoli assunti tramite l'alimentazione era fino ad oggi difficile data l'assenza di un database di composizione degli alimenti che contenesse le informazioni relative alla quantità di tali composti presenti negli alimenti di origine vegetale. Recentemente, il French National Institute for Agricultural Research<sup>23</sup> ha sviluppato un database sul contenuto di polifenoli della maggior parte degli alimenti di origine vegetale, definito "*Phenol-Explorer*", contenente i dati più recenti disponibili in letteratura ed i dati del database dell'U.S. Department of Agriculture (USDA)<sup>24-25</sup>. L'utilizzo di tale database consente, oggi, di ottenere una stima della quantità di polifenoli, e delle relative sottoclassi, assunta da diverse popolazioni. Pertanto, mentre davvero scarsi sono i dati relativi al consumo di polifenoli e delle relative sottoclassi nella popolazione generale dei vari paesi del mondo<sup>26-27</sup>, ben documentate sono le informazioni relative all'assunzione di fibra.

#### 3.1 Dati dalla letteratura

In Italia, i primi dati relativi al consumo di polifenoli sono stati ottenuti dall'indagine INRAN-SCAI 2005-2006<sup>28</sup>. Tale indagine ha consentito di ottenere una stima dell'apporto di *flavonoidi* e *acidi fenolici* utilizzando i dati di composizione della banca dati "*Phenol-Explorer*"<sup>23</sup> integrati con i dati di alimenti italiani<sup>29-33</sup>, quando disponibili. I valori mediani di assunzione di *flavonoidi* stimati nella popolazione adulta italiana sono 87 mg/die nelle donne (media: 112 mg/die) e 99 mg/die negli uomini (media: 122 mg/die) e le principali fonti sono rappresentate da "Acqua e bevande analcoliche (caffè e succhi di frutta)", "Bevande alcoliche" e "Verdura e Ortaggi". Per quanto riguarda gli *acidi fenolici* (come somma degli acidi idrossibenzoici e idrossicinnamici), i valori mediani di assunzione stimati sono 332 mg/die nelle donne (media: 377

mg/die) e 373 mg/die negli uomini (media: 426 mg/die) e le principali fonti sono rappresentate dal gruppo “Acqua e bevande analcoliche (caffè e succhi di frutta)”, “Frutta” e “Verdura e Ortaggi”.

Per gli altri paesi Europei, i dati disponibili in letteratura sul consumo di polifenoli sono davvero scarsi. Chun OK et al. riportano un consumo di *flavonoidi* nella popolazione adulta degli Stati Uniti pari a 1g/giorno<sup>34</sup>; stesso consumo è riportato da Ovaskainen ML et al. in una popolazione di adulti finlandesi<sup>27</sup>. Per la popolazione spagnola, Gonzalez S. et al. riportano dei valori medi di assunzione di *polifenoli totali* stimati pari a 358.8 mg per gli uomini e 279.6 mg per le donne, rappresentati principalmente dai *flavonoidi* (62% del consumo di polifenoli totali) e dagli *acidi fenolici* (35.5% del consumo di polifenoli totali). I principali alimenti che contribuiscono al consumo di *flavonoidi totali* sono “Bevande alcoliche” e “Frutta e verdura”; per quanto riguarda, invece, gli acidi fenolici sono “Bevande analcoliche (caffè)”, “Bevande alcoliche”, “Frutta” e “Cereali”<sup>35</sup>.

Molti sono i dati disponibili in letteratura per quanto riguarda il consumo di *fibra alimentare* delle diverse popolazioni del mondo. Dai dati dell'indagine INRAN-SCAI 2005-2006 sui consumi della popolazione italiana<sup>28</sup> risulta che l'assunzione mediana di *fibra alimentare* è pari a 18,6 g/die e 17,1 g/die, rispettivamente per uomini e donne<sup>36</sup>. Nella coorte EPIC l'assunzione mediana di *fibra* è di 24 g/giorno negli uomini e di 21g/giorno nelle donne. La fonte principale di *fibra* è rappresentata dal gruppo dei cereali e derivati (43%) e anche qui il pane è il principale contributore fornendo il 28% della fibra assunta, seguito dalla pasta (6% della fibra) e da torte e biscotti (4% della fibra). Il secondo gruppo contributore è la frutta (31%), seguita dal gruppo dei vegetali (16%) tra cui al primo posto compaiono i vegetali a frutto 7% seguiti dal 3% dei vegetali a foglia e dal 3% delle cipolle e carote. Il terzo gruppo di alimenti fornitori



di fibra è rappresentato dai legumi che forniscono circa il 5% della fibra negli uomini e oltre l' 8% nelle donne. Il quarto gruppo è costituito dalle patate (2%).

#### **4. Effetti metabolici derivanti dal consumo di composti bioattivi di origine vegetale**

Negli ultimi anni, un numero crescente di studi epidemiologici e di intervento hanno mostrato gli effetti protettivi dei composti bioattivi di origine vegetale su importanti patologie, come le malattie cardiovascolari, il cancro, l'osteoporosi, il diabete mellito<sup>37-41</sup>.

Recentemente, è stato anche evidenziato come tali effetti non sono dovuti esclusivamente alle proprietà antiossidanti di tali composti, ma anche alla capacità di modulare molteplici attività cellulari, come l'effetto inibente o riducente su alcuni enzimi quali telomerasi, ciclossigenasi, lipossigenasi, e di interagire con i processi di trasduzione del segnale e con i recettori cellulari.

Tuttavia, mentre per le *fibre* le evidenze disponibili in letteratura sono molte e tutte concordi, la maggior parte delle informazioni disponibili sugli effetti dei *polifenoli* presenta diversi punti critici. In primo luogo, la maggior parte degli studi sono stati condotti in modelli animali, pertanto quelli sull'uomo sono pochi ed hanno prodotto risultati discordanti; inoltre, la maggior parte degli studi utilizza dosi farmacologiche di polifenoli, di molto superiori a quelle che è possibile assumere quotidianamente con l'alimentazione e, in genere, sono stati utilizzati estratti di singoli polifenoli.

##### *4.1 Dati dalla letteratura*

Diversi studi hanno valutato l'associazione tra il consumo di alcuni sottogruppi di *polifenoli* e gli alimenti che li contengono con l'incidenza di malattie croniche degenerative, quali pressione arteriosa, profilo lipidico, funzione endoteliale, etc.<sup>42-45</sup>.

Studi epidemiologici suggeriscono che le *proantocianidine* proteggono dalle malattie cardiovascolari prevalentemente attraverso la regolazione dell'omeostasi lipidica. In

studi condotti su modelli animali è stato ampiamente dimostrato che questa classe di polifenoli riduce nel plasma i livelli di trigliceridi, di VLDL (lipoproteine ricche in trigliceridi) e di LDL (lipoproteine ricche in colesterolo) per inibizione della secrezione epatica delle VLDL. Questa evidenza non è affatto confermata nell'uomo, in quanto i risultati sono molto contrastanti.

L'effetto ipolipidemizzante delle *proantocianidine* potrebbe essere legato al rallentato assorbimento intestinale dei lipidi e del colesterolo ed alla successiva ridotta secrezione di chilomicroni a causa di una minore disponibilità nell'enterocita di lipidi necessari all'assemblaggio dei chilomicroni. L'evento primario potrebbe essere a livello dell'idrolisi dei trigliceridi esogeni ad opera della lipasi pancreatica la cui attività sembra essere inibita dalle proantocianidine. Queste ultime promuovono parallelamente l'escrezione di steroidi neutri e di acidi biliari riducendone il loro assorbimento e di conseguenza la sintesi del colesterolo esterificato<sup>46</sup>.

Diversi studi nei ratti hanno mostrato come anche le *catechine* del tè (EC, EGC, ECG e EGCG) inibiscono l'attività della lipasi pancreatica, riducendo l'ipertrigliceridemia post-prandiale, per rallentato assorbimento dei trigliceridi<sup>46</sup>. Inoltre, le *catechine* potrebbero contribuire alla correzione dell'obesità agendo sul bilancio energetico. È stato, infatti, osservato che un consumo di 690 mg/die di *catechine* per un periodo di 12 settimane aumenta la spesa energetica nell'uomo riducendo la massa grassa<sup>47</sup> attraverso una aumentata captazione del glucosio nel muscolo scheletrico a sfavore della sua captazione nel tessuto adiposo.

Sono stati esaminati, inoltre, gli effetti degli estratti del tè verde sull'ipertensione arteriosa nei ratti. Gli animali sono stati trattati con angiotensina II per indurre lo sviluppo dell'ipertensione. Alla fine dell'esperimento, questi animali mostravano un aumento della pressione arteriosa e della massa del ventricolo sinistro.

Sottoponendo, poi, gli stessi animali all'assunzione di tè verde, si osservava una riduzione dell'attività dell'Angiotensina II, dell'espressione aortica endoteliale dell'emeossigenasi I e delle superossidodismutasi, indicando così, una riduzione dello stress ossidativo vascolare<sup>48</sup>.

I *flavonoidi* del cioccolato possiedono proprietà anti-infiammatorie, esplicate attraverso la modulazione dell'attività dell'interleuchina-5 e del TNF- $\alpha$ . Essi influenzano il metabolismo e la produzione dell'ossido nitrico endoteliale, riducendo l'attivazione delle piastrine e delle cellule endoteliali attraverso l'inibizione dello stress ossidativo<sup>49</sup>.

Comparando gli effetti del cioccolato fondente con quelli del cioccolato a latte, in soggetti sani e in soggetti fumatori (caratterizzati questi ultimi da un aumento dello stress ossidativo e dell'aggregazione piastrinica), il cioccolato fondente ha mostrato in soggetti fumatori la capacità di inibire l' 8-iso-PGF2 $\alpha$  piastrinico, per una down-regulation nella formazione dei ROS, indotta dalla NADPH ossidasi (NOX-2) piastrinica. L'effetto antiossidante e antiaggregante piastrinico non è osservato nei non-fumatori, suggerendo che la generazione dei ROS è un prerequisito fondamentale per l'induzione dello stress ossidativo.

I *flavonoidi* del cacao sembrano diminuire i livelli di pressione arteriosa ed aumentare la dilatazione flusso-mediata<sup>49</sup>.

Anche il *resveratrolo* aumenta nelle cellule endoteliali la produzione dell'ossido nitrico (potente vasodilatatore) ed inibisce l'attività della COX-2 riducendo, di conseguenza, la produzione di PGF2 $\alpha$ . Inoltre, rallenta il rilascio dell'IL-8, protegge i lipidi dalla perossidazione lipidica e inibisce l'assorbimento delle LDL-ossidate nella parete vascolare grazie alla sua capacità di scavenger dei ROS e di chelare i metalli

(particolarmente il rame). In più, blocca l'aggregazione piastrinica inibendo l'adesione delle stesse al collagene<sup>50</sup>.

È stato dimostrato che il *resveratrolo* migliora anche l'omeostasi del glucosio nei ratti. Tale effetto potrebbe essere correlato ad un aumento dell'attività del PGC-1 $\alpha$ , un coattivatore trascrizionale che regola i geni coinvolti nel metabolismo energetico<sup>51</sup>.

Anche la *fibra* alimentare, in particolar modo quella solubile (quali pectine, gomme, beta-glucani, mucillagini ed emicellulose), è in grado di influenzare il metabolismo lipidico.

Un consumo di 5-10 g/die di fibre solubili riduce del 5% le concentrazioni plasmatiche del colesterolo-LDL<sup>52</sup>. Una meta-analisi di 67 studi di intervento ha concluso che per ogni grammo di fibra solubile introdotta si osserva una riduzione di circa 2 mg/dl delle concentrazioni plasmatiche di colesterolo totale e di 2.5 mg/dl di quello delle LDL, con piccole variazioni a seconda degli studi e della dose di fibra utilizzata<sup>53</sup>. Tale effetto ipo-colesterolemizzante dipende dalla loro capacità di ridurre l'assorbimento intestinale del colesterolo a livello intestinale e di incrementarne l'escrezione fecale.

Nessun effetto significativo si osserva, invece, sulle concentrazioni plasmatiche dei trigliceridi e del colesterolo HDL.

Una Cochrane Review ha analizzato gli studi d'intervento randomizzati che hanno specificamente valutato l'effetto del consumo di cereali integrali (una potenziale fonte di fibre solubili) sui markers lipidici di rischio cardiovascolare<sup>54</sup>. In particolare, otto studi che esaminavano gli effetti dell'avena e dei suoi derivati (b-glucani) sul profilo lipidico, hanno chiaramente indicato la sua efficacia nel ridurre i livelli plasmatici del

colesterolo LDL. In questi studi non si osservava alcun effetto sui livelli ematici di trigliceridi ed HDL-colesterolo.

Pertanto, alcune fibre possono contribuire alla riduzione delle concentrazioni plasmatiche del colesterolo totale e delle LDL. Gli effetti sono evidenti anche per quantità che vengono solitamente consumate attraverso gli alimenti naturali, senza uso di integratori.

I dati concernenti l'efficacia di fibre consumate sotto forma di supplemento sono limitati e specifici per alcune tipologie di fibre, quali i beta-glucani, il guar e i glucomannani<sup>55-56</sup> e non appaiono cumulabili rispetto all'effetto ottenibile con quantità adeguate di fibra alimentare consumate con gli alimenti comuni (legumi, cereali integrali, verdure e frutta)<sup>57-58</sup>.

Un altro aspetto importante da tener presente è che gli alimenti ricchi in fibra sono spesso caratterizzati da un basso indice glicemico; questa caratteristica consente di ridurre il picco glicemico in fase post-prandiale, inducendo effetti benefici sulla tolleranza al glucosio sia in soggetti diabetici che non-diabetici<sup>59</sup>. Inoltre, è stata osservata una significativa riduzione dei livelli plasmatici di insulina in fase postprandiale dopo 12 settimane di consumo di prodotti a base di cereali integrali<sup>60</sup>.

Ampiamente dimostrato è anche l'effetto del consumo di fibra sui valori glicemici del pasto successivo. Infatti, il consumo di alimenti ad alto contenuto in fibra, specialmente da cereali integrali e legumi, abbassa i livelli di glicemia della giornata, con particolare riferimento al pasto successivo<sup>61</sup>.

## **5. La Dieta Mediterranea: un modello per promuovere il consumo di composti bioattivi di origine vegetale**

Nel corso degli anni, le numerose evidenze sulla relazione esistente fra nutrizione e malattie croniche invalidanti hanno portato gli studiosi a ricercare il modello di alimentazione più idoneo al mantenimento di un buono stato di salute. Diversi modelli di dieta si sono imposti all'attenzione, ma quella che ha riscosso interesse è sicuramente la Dieta Mediterranea.

Il concetto di Dieta Mediterranea risale agli anni '60, quando Ancel Keys coniò questo termine in seguito ai risultati del *Seven Country Study* che dimostrarono che le popolazioni che si affacciavano nel bacino del Mediterraneo, quali Italia e Grecia, presentavano una ridotta incidenza di malattie cardiovascolari e tumori rispetto alle altre popolazioni studiate<sup>62-63</sup>.

Successivamente, i risultati di numerosi studi epidemiologici e clinici hanno chiaramente indicato che nelle popolazioni del bacino del Mediterraneo, che consumano in prevalenza pasta, pesce, prodotti ortofrutticoli e che utilizzano l'olio d'oliva come grasso da condimento, la percentuale di mortalità per cardiopatia ischemica è molto più bassa rispetto ai soggetti che vivono in Paesi come quelli del Nord-Europa, dove il regime alimentare quotidiano include l'assunzione di molti grassi saturi (burro, strutto, latte, carne rossa).

Con il progredire delle conoscenze scientifiche è risultato sempre più chiaro il coinvolgimento dei "*phytochemicals*" in numerosi processi biochimici e fisiologici e il ruolo che possono esercitare come fattori protettivi della salute<sup>62-81</sup>. I componenti bioattivi della dieta Mediterranea caratterizzati da diversa struttura chimica, quali principalmente polifenoli e fibra, hanno mostrato, in vari studi sperimentali, di esercitare un'azione preventiva verso le malattie cronico-degenerative grazie alla

loro attività antiossidante che si esplica soprattutto nel contrastare i processi ossidativi a carico delle più importanti macromolecole biologiche (carboidrati, lipidi, proteine). In realtà queste molecole intervengono in numerosi altri processi cellulari e tissutali, per esempio, sono in grado di interagire e modulare sistemi multi-enzimatici, di inibire l'aggregazione piastrinica, di contrastare la carcinogenesi, di ridurre la formazione di molecole infiammatorie. I conseguenti effetti anti-aggreganti, anti-infiammatori e anti-ipertensivi sono ritenuti di grande importanza nella prevenzione dell'aterosclerosi.

Nel corso degli ultimi anni, notevole interesse ha suscitato lo studio dell'adesione alla Dieta Mediterranea in relazione alle malattie cardiovascolari (e neoplastiche), in termini di incidenza, progressione della malattia e mortalità. E' stato dimostrato, infatti, come una stretta adesione a tale modello alimentare sia correlata ad una minore incidenza di mortalità.

Nel 2003, Trichopoulou et al., allo scopo di trovare uno strumento utile a definire il grado di adesione al modello alimentare Mediterraneo, hanno stabilito uno score di adesione in relazione al consumo di alimenti tipicamente presenti in tale modello, quali pane, pasta, frutta, verdura, pesce, legumi, vino rosso in moderazione e olio di oliva<sup>75</sup>. Questo score veniva calcolato dando un punteggio pari ad 1 a coloro che consumavano questi alimenti in misura maggiore rispetto alla mediana della popolazione, ed un punteggio pari a 0 a coloro il cui consumo di tali alimenti era al di sotto della mediana della popolazione. Lo score finale variava da 0 (che rappresentava, quindi, una bassa adesione alla Dieta Mediterranea) a 9 (che rappresentava, invece, una ottima adesione a tale modello).

Dai risultati di tale studio è stato possibile documentare, su una popolazione di oltre 20.000 soggetti seguiti per 44 mesi, che il rischio di mortalità era inversamente



correlato al grado di adesione alla Dieta Mediterranea valutato attraverso l'elaborazione di questo score. Inoltre, è stato osservato che un incremento di 2 punti in tale punteggio era associato in modo significativo ad una riduzione del 25% della mortalità globale.

In conclusione, la funzione protettiva delle molecole bioattive presenti del mondo vegetale può essere la chiave per comprendere come a dispetto dei cambiamenti dei consumi alimentari dagli anni 60 ad oggi, il profilo della salute dei Paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo risulti ancora più favorevole rispetto agli altri Paesi Occidentali.

## 6. Linea di ricerca

Nonostante l'importanza della relazione tra assunzione di composti bioattivi di origine vegetale e modulazione dei fattori di rischio cardiovascolare, ancora pochi studi sono disponibili in letteratura per valutare tali effetti sull'uomo, in particolare per quanto concerne i polifenoli.

Pertanto, al fine di chiarire queste problematiche, la linea di ricerca che ho seguito durante il corso di Dottorato si è sviluppata in tre tematiche principali:

1. Valutazione degli effetti di diete arricchite in polifenoli sul profilo di rischio cardiovascolare nell'ambito di uno studio teso a valutare sia gli effetti di diete ricche in polifenoli che di diete ricche in omega-3: *Progetto ETHERPATHS*.
2. Valutazione delle abitudini alimentari in pazienti con diabete tipo 2 e relazione con lo stato di salute (controllo glicemico, profilo di rischio cardiovascolare, infiammazione subclinica): *Progetto TOSCA.IT*.
3. Valutazione dell'adesione al modello alimentare Mediterraneo mediante sviluppo di un questionario di frequenza per valutare in modo semplice e rapido l'adesione a tale modello e screening di popolazione per la valutazione dei fattori che possono influenzare l'adesione a tale modello: *Progetto MEDIQUEST*.

Nell'ambito di queste tematiche, sono stati effettuati vari studi di cui riporterò i risultati principali nei capitoli seguenti e che sono stati oggetto di pubblicazioni (riportate in "Pubblicazioni").

## 7. Studi Sperimentali

7.1 Tematica 1 - Valutazione degli effetti di diete arricchite in polifenoli sul profilo di rischio cardiovascolare: Progetto ETHERPATHS (pubblicazione n. 1-2, 13-17, 28, 30)

**Introduzione:** L'alimentazione, grazie alla sua azione pleiotropica su molteplici meccanismi, può avere un ruolo di primaria importanza nel prevenire o correggere contemporaneamente diversi fattori di rischio cardio-metabolico. Tra questi fattori di rischio, le alterazioni del metabolismo glico-lipidico a digiuno e nel periodo postprandiale sono sicuramente tra quelli più rilevanti<sup>82-83</sup>.

Tra i vari componenti della dieta che potrebbero influenzare il metabolismo, gli acidi grassi  $\omega 3$  e, ancora più recentemente, i polifenoli, hanno suscitato molto interesse.

Numerosi studi epidemiologici hanno suggerito che gli acidi grassi  $\omega 3$  e i polifenoli possano esercitare un ruolo importante nella prevenzione delle malattie cardiovascolari<sup>84-85</sup> e del diabete<sup>86-87</sup>.

Le evidenze derivanti da studi di intervento che hanno indagato sugli effetti degli acidi grassi  $\omega 3$  mostrano che la loro azione benefica è evidente anche con dosi relativamente basse e quindi facilmente raggiungibili con un approccio nutrizionale adeguato<sup>88</sup>. Tuttavia molto poco si sa sui meccanismi alla base dell'effetto benefico di questi acidi grassi.

Per quanto riguarda il ruolo svolto dai polifenoli nella prevenzione del rischio cardiovascolare, gli studi di intervento sono scarsi e presentano risultati contrastanti. In particolare essi hanno evidenziato gli effetti di polifenoli contenuti in singoli alimenti (tè, cioccolato, vino rosso, etc.) e non di diete contenenti diverse fonti di

polifenoli<sup>89-94</sup>. D'altra parte se gli effetti dei polifenoli non sono chiari, ancora più sconosciuti sono i meccanismi attraverso cui essi potrebbero agire.

**Scopo:** Valutare l'effetto a medio termine di diete a diverso contenuto di polifenoli sul metabolismo glico-lipidico a digiuno e in fase postprandiale in individui ad elevato rischio di sviluppare diabete e malattie cardiovascolari.

## **Materiali e metodi**

*Partecipanti:* Sono stati reclutati 86 soggetti, di ambo i sessi, di età compresa tra 35 e 70 anni, in sovrappeso/obesi (27-35 kg/m<sup>2</sup>), con circonferenza vita elevata (>102 cm nell'uomo e >88 cm nella donna) e almeno un altro parametro caratteristico della sindrome metabolica secondo i criteri NCEP-ATPIII<sup>95</sup>:

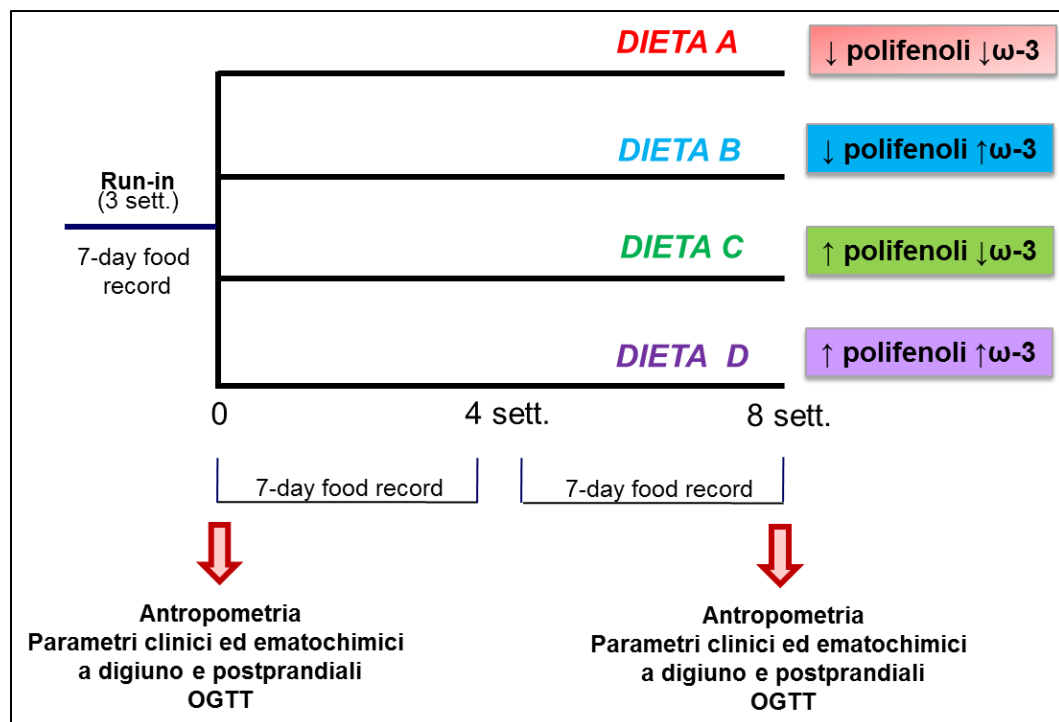
- trigliceridemia a digiuno  $\geq 150$  mg/dl;
- HDL- colesterolo a digiuno <40 mg/dl e nell'uomo e <50 mg/dl nella donna;
- pressione arteriosa  $\geq 130/85$  mmHg;
- glicemia a digiuno  $\geq 100$  mg/dl.

I criteri di esclusione erano: età <35 e >70 anni), trigliceridemia a digiuno  $\geq 400$  mg/dl, colesterolemia a digiuno >270 mg/dl, eventi cardiovascolari nei 6 mesi precedenti allo studio (infarto del miocardio o ictus), diabete mellito o qualsiasi altra patologia cronica, attività fisica intensa, insufficienza renale o epatica (creatinina >1.7 mg/dl e ALT/AST >2 volte i valori normali, rispettivamente), anemia (Hb <12 g/dl), assunzione di farmaci anti-infiammatori o ipolipemizzanti. Tutti i partecipanti hanno firmato il consenso informato prima di essere inclusi nello studio. Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e registrato su ClinicalTrials.gov, numero identificativo NCT01154478.

*Disegno dello studio:* Lo studio è stato condotto secondo un disegno fattoriale 2x2 (Figura 1). Lo studio è stato preceduto da un periodo di osservazione di 3 settimane (*run-in*) durante il quale i partecipanti hanno continuato a seguire la loro dieta abituale. Alla fine del *run-in*, i partecipanti sono stati assegnati, in maniera del tutto casuale, ad uno dei seguenti trattamenti nutrizionali per un periodo di 8 settimane:

- Gruppo A: dieta a basso contenuto di acidi grassi  $\omega 3$  e polifenoli (Dieta Controllo).
- Gruppo B: dieta ricca in acidi grassi  $\omega 3$  e povera in polifenoli (Dieta Omega-3).
- Gruppo C: dieta ricca in polifenoli e povera in acidi grassi  $\omega 3$  (Dieta Polifenoli).
- Gruppo D: dieta ricca sia in acidi grassi  $\omega 3$  sia in polifenoli (Dieta Omega-3 + Polifenoli).

**Figura 1.** Disegno dello studio



La randomizzazione, stratificata per età, sesso, BMI e trigliceridi plasmatici, è stata effettuata con il metodo di minimizzazione utilizzando il software MINIM ([www.users.york.ac.uk](http://www.users.york.ac.uk)). Le quattro diete erano isoenergetiche, per evitare le variazioni di peso corporeo durante lo studio, ed avevano la stessa composizione in macro e micronutrienti. L'unica differenza era rappresentata dal contenuto di acidi grassi  $\omega 3$  e polifenoli (Tabella 1).

**Tabella 1.** Composizione media della dieta assegnata e seguita nei 4 gruppi sperimentali.

	Dieta Controllo		Dieta Omega-3		Dieta Polifenoli		Dieta Omega-3 + Polifenoli	
	Assegnata	Seguita	Assegnata	Seguita	Assegnata	Seguita	Assegnata	Seguita
<b>Energia (kcal)</b>	2524±366	2345±472	2718±283	2602±248	2622±456	2539±459	2507±452	2407±471
<b>Proteine (%)</b>	15.7±0.0	16.0±1.2	15.7±0.0	15.9±0.6	15.7±0.0	15.8±0.5	15.7±0.0	15.8±0.6
<b>Grassi totali (%)</b>	33.6±0.0	32.5±1.7	33.6±0.0	33.2±1.9	33.6±0.0	33.9±1.4	33.6±0.0	33.8±1.5
<b>SFA (%)</b>	7.2±0.1	7.2±0.3	7.3±0.0	7.3±0.4	7.1±0.0	7.3±0.4	7.2±0.3	7.4±0.5
<b>PUFA n-3 (%)</b>	0.5±0.0	0.5±0.0	1.5±0.0	1.4±0.1*	0.5±0.4	0.5±0.1	1.5±0.1	1.5±0.2*
<b>EPA (%)</b>	0.02±0.01	0.02±0.01	0.43±0.02	0.40±0.06*	0.04±0.01	0.04±0.01	0.47±0.02	0.46±0.06*
<b>DHA (%)</b>	0.01±0.01	0.01±0.01	0.58±0.02	0.53±0.08*	0.01±0.0	0.01±0.01	0.60±0.03	0.59±0.08*
<b>Carboidrati (%)</b>	50.7±0.0	51.5±1.0	50.7±0.0	50.9±1.9	50.7±0.0	50.4±1.4	50.7±0.0	50.3±1.9
<b>Fibre (g)</b>	28.7±0.2	26.8±4.4	28.4±0.2	27.8±3.9	29.0±0.9	27.5±2.2	28.4±0.3	27.2±2.8
<b>Polifenoli (mg)</b>	365±3	336±79	363±2	377±55	2903±19	2776±234 <sup>§</sup>	2861±42	2667±400 <sup>§</sup>

I dati sono espressi come Media±DS.

\*  $p < 0.0001$  vs. dieta seguita nei gruppi assegnati alla Dieta Controllo e la Dieta Polifenoli; <sup>§</sup>  $p < 0.0001$  vs. dieta seguita nei gruppi assegnati alla Dieta Controllo e la Dieta Omega-3 (ANOVA e *post-hoc*).

Tale differenza è stata ottenuta mediante la selezione di alimenti e bevande naturali presenti in commercio. Le maggiori fonti di polifenoli erano rappresentate da: carciofi, cipolle, rucola, spinaci, arance, succo di mirtillo, cioccolato fondente, caffè decaffeinato, te deinato e olio extra-vergine di oliva. Le fonti di acidi grassi  $\omega 3$  erano: salmone, dentice e alici (Tabella 2).

**Tabella 2.** Principali alimenti caratterizzanti le diete sperimentali

Dieta Controllo	Dieta Omega-3	Dieta Polifenoli	Dieta Omega-3 + Polifenoli
Latte parzialmente scremato	Latte parzialmente scremato	Tè verde	Tè verde
Marmellata di arance	Marmellata di arance	Marmellata di mirtilli	Marmellata di mirtilli
Minestrone	Minestrone	Carciofi	Carciofi
Cavolfiore	Cavolfiore	Spinaci	Spinaci
Peperoni	Peperoni	Rucola	Rucola
Zucca	Zucca	Cipolle	Cipolle
	Salmone		Salmone
	Dentice/Alici		Dentice/Alici
Olio d'oliva	Olio d'oliva	Olio extra vergine d'oliva	Olio extra vergine d'oliva
Cioccolato bianco	Cioccolato bianco	Cioccolato fondente	Cioccolato fondente
Caffè decaffeinato n.1	Caffè decaffeinato n.1	Caffè decaffeinato n.4	Caffè decaffeinato n.4

La composizione delle diete sperimentali è stata calcolata mediante il software MetaDieta (Meteda s.r.l., Ascoli-Piceno) che utilizza i dati nutrizionali contenuti nelle Tabelle Italiane di Composizione degli Alimenti<sup>96</sup>. I dati relativi al contenuto di polifenoli e l'indice ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) sono stati ottenuti da tabelle nutrizionali specifiche<sup>24-25</sup>. Il contenuto di polifenoli di tè, caffè, cioccolato e succo di mirtillo è stato misurato direttamente mediante il saggio di Folin-Ciocalteu<sup>97</sup>. Il fabbisogno energetico della dieta sperimentale è stato definito sulla base dell'introito energetico abituale individuale valutato mediante il diario alimentare (*7-day food records*) completato durante il *run-in*, e aggiustato per peso corporeo e giudizio clinico della dietista per evitare la possibile sottostima, comune nei soggetti in sovrappeso/obesi. Tutti i partecipanti hanno compilato il *7-day food records* a 4 e 8 settimane per valutare l'adesione al trattamento dietetico. L'adesione alle diete raccomandate è stata considerata adeguata se l'introito era almeno l'80% di quello raccomandato. I partecipanti assegnati alla dieta di controllo sono stati considerati complianti se l'assunzione di polifenoli e acidi grassi  $\omega 3$  non era superiore al 20% delle raccomandazioni. Per aumentare l'adesione al trattamento, gli alimenti e le bevande sono stati forniti ai partecipanti per tutta la durata del protocollo sperimentale. I pasti che necessitavano una preparazione sono stati cucinati e confezionati da un servizio di catering qualificato, sotto la supervisione di una dietista. Inoltre, tutti i partecipanti sono stati contattati ogni settimana da una dietista per rinforzare la motivazione a proseguire correttamente lo studio. All'inizio e alla fine dello studio sono state rilevate le misure antropometriche, mediante metodiche standardizzate<sup>98</sup> e tutti i partecipanti sono stati sottoposti ad un test da carico orale di glucosio (OGTT) della durata di 3 ore per la valutazione della tolleranza glucidica.



Inoltre, è stato valutato il profilo glico-lipidico a digiuno e dopo un pasto test (1000 kcal, Tabella 3). Il pasto test era composto da riso, burro, parmigiano, bresaola e pane bianco; olio d'oliva, olio extra vergine di oliva, salmone e tè verde decaffeinato sono stati impiegati in modo da ottenere una composizione simile alla dieta assegnata (Tabella 3).

**Tabella 3.** Composizione del pasto test

Caratteristiche	Dieta Controllo	Dieta Omega-3	Dieta Polifenoli	Dieta Omega-3 + Polifenoli
<b>Alimenti e bevande</b>	Riso 75 g	Riso 75 g	Riso 75 g	Riso 75 g
	Burro 60 g	Burro 58 g	Burro 60 g	Burro 58 g
	Pane bianco 33 g	Pane bianco 33 g	Pane bianco 33 g	Pane bianco 33 g
	Parmigiano 19 g	Parmigiano 18 g	Parmigiano 19 g	Parmigiano 18 g
	Bresaola 50 g	Bresaola 10 g	Bresaola 47 g	Bresaola 10 g
	Olio di oliva 6 g	Salmone 70 g	Olio extra-vergine di oliva 6 g	Salmone 70 g
			Tè verde decaffeinato 250 ml	Tè verde decaffeinato 250 ml
<b>Energia (kcal)</b>	998	994	998	999
<b>Proteine (%)</b>	12	12	12	12
<b>Grassi (%)</b>	57	57	57	57
<b>SFA (%)</b>	31	31	31	31
<b>Carboidrati (%)</b>	31	31	31	31
<b>ω-3 (g)</b>	0.94	2.31	0.92	2.31
<b>EPA (g)</b>	0.05	0.63	0.05	0.63
<b>DHA (g)</b>	0	0.83	0	0.83
<b>Polifenoli (mg)</b>	50	50	770	770

A digiuno e ogni ora, per una durata totale di 6 ore, sono stati effettuati dei prelievi ematici per analizzare le concentrazioni di colesterolo e trigliceridi, nel plasma e nelle lipoproteine ricche in trigliceridi (chilomicroni e VLDL grandi) e dell'apolipoproteina B48 nelle VLDL grandi. Inoltre, ai partecipanti è stato chiesto di raccogliere un campione di urina proveniente dalla raccolta delle 24 ore per il dosaggio dell'8-isoprostano, un marcatore di stress ossidativo.

*Procedure di laboratorio:* I Chilomicroni (unità di flottazione Svedberg, Sf> 400) e le VLDL grandi (Sf 60-400) sono stati isolati dal plasma mediante ultracentrifugazione per gradiente di densità discontinua, come precedentemente descritto<sup>99</sup>. Le HDL sono state isolate dal plasma mediante metodo di precipitazione con acido fosfotungstenico/cloruro di magnesio. Il colesterolo LDL è stato calcolato mediante la formula di Friedewald. Le concentrazioni di colesterolo, trigliceridi e glucosio sono state dosate con metodi enzimatici-colorimetrici standard (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germania) sull'autoanalizzatore Cobas Mira (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia). Le concentrazioni di ApoB48 nelle VLDL grandi (Shibayagi Co., Ltd., Shibukawa, Gunma, Giappone), insulina (DIAsource ImmunoAssays S.A., Nivelles, Belgio) e GLP-1 (Merck-Millipore, Darmstadt, Germania) sono state analizzate con metodi ELISA automatizzati sull'autoanalizzatore Triturus (Grifols Italia SpA, Pisa, Italia). Il dosaggio dell'8-isoprostano nelle urine è stato eseguito con un metodo immuno-enzimatico manuale (Cayman EIA kit) e letti in spettrofotometria (DiaSorin EtiStar). Tutte le valutazioni sono state effettuate prima e dopo l'intervento di 8 settimane dal personale che non era a conoscenza del trattamento seguito dai partecipanti.

*Calcoli:* La risposta postprandiale al pasto o al carico orale di glucosio sono state valutate come area sotto la curva (AUC) che è stata calcolata con il metodo trapezoidale. Inoltre, sono stati calcolati i seguenti indici OGTT-derivati:

- Insulino-sensibilità a digiuno, valutata con l'indice QUICKI (*quantitative insulin sensitivity check index*:  $1/\log(\text{glicemia a digiuno, mg/dl}) + \log(\text{insulina a digiuno, mU/L})$ )<sup>100</sup>
- Secrezione insulinica, valutata con l'indice HOMA- $\beta$  (*homeostasis assessment method of the beta-cell*:  $[(360 \text{ insulina} \cdot \text{digiuno, mU/L})/(\text{glicemia a digiuno, mg/dl} - 63)]$ )<sup>101</sup>
- Secrezione precoce dell'insulina (AUC insulina 0-30 minuti)
- Insulino-sensibilità post-carico, mediante l'indice OGIS (*oral glucose insulin sensitivity method*)<sup>100</sup>
- Secrezione insulinica post-carico, mediante l'indice di funzione  $\beta$ -cellulare (rapporto AUC insulina/AUC glucosio)<sup>100</sup>

*Analisi statistica:* Al fine di rilevare una differenza del 30% della AUC dei trigliceridi nei chilomicroni e nelle VLDL larghe dopo un pasto ricco di grassi, tra i 4 trattamenti sperimentali, con una potenza di 80% al 5% livello di significatività, dovevano essere reclutati 80 pazienti. Tale differenza è clinicamente rilevante e corrisponde alla differenza osservata tra i pazienti affetti da diabete tipo 2 e controlli sani in uno studio precedente. I risultati dello studio sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard (SD), se non diversamente specificato. Le variabili non normalmente distribuite sono state analizzate dopo la trasformazione logaritmica. I dati sono stati analizzati per *intention to treat* in tutti i soggetti che hanno completato lo studio. Un'analisi *per protocol* avrebbe comunque prodotto gli stessi risultati perché tutti i

partecipanti erano complianti al trattamento. Le differenze tra i quattro gruppi al basale sono state testate con l'ANOVA (Analisi della Varianza) e l'analisi *post-hoc* (LSD). Gli effetti di polifenoli, acidi grassi  $\omega 3$  e della loro interazione, sono stati valutati con l'ANOVA a due fattori prendendo in considerazione le variazioni assolute osservate (valori a 8 settimane – valori basali) aggiustate utilizzando i valori basali come covariata. Infine, gli effetti dei trattamenti dietetici sui profili post-prandiali (OGTT, pasto test) sono stati valutati in con un modello lineare generale per misure ripetute. L'analisi statistica è stata eseguita secondo i metodi standard mediante il software Statistical Package for Social Sciences versione 21.0 (SPSS/PC; SPSS, Chicago, IL, USA).

## **Risultati**

*Caratteristiche dei partecipanti:* Settantotto soggetti hanno completato lo studio (Dieta Controllo, n=20; Dieta Omega-3, n=19; Dieta Polifenoli, n=20; Dieta Omega-3 + Polifenoli, n=19) e sono stati inclusi nell'analisi. Tuttavia, per problemi tecnici, i dati relativi alla risposta all'OGTT non erano disponibili per un soggetto appartenente al gruppo che aveva seguito la Dieta Polifenoli. Al basale, i partecipanti assegnati ai quattro gruppi sperimentali erano sovrapponibili per età, peso corporeo, BMI, pressione arteriosa, concentrazioni plasmatiche di lipidi, glucosio, insulina, GLP-1 e insulino-sensibilità valutata con l'indice QUICKI. Inoltre, 15 partecipanti avevano alterata glicemia a digiuno (IFG) (Dieta Controllo, n=5; Dieta Omega-3, n=6; Dieta Polifenoli, n=6; Dieta Omega-3 + Polifenoli, n=8); 8 partecipanti avevano una ridotta tolleranza al glucosio (IGT) (Dieta Controllo, n=1; Dieta Omega-3, n=4; Dieta Polifenoli, n=2; Dieta Omega-3 + Polifenoli, n=1); 18 partecipanti hanno avuto IFG + IGT (Dieta Controllo, n= 4; Dieta Omega-3, n=5; Dieta Polifenoli, n=7; Dieta Omega-3 +

Polifenoli, n=2). Il peso corporeo è stato relativamente stabile durante l'intervento, con piccole riduzioni a 8 settimane (Dieta Controllo:  $-0.11 \pm 0.67$ ; Dieta Omega-3:  $-1.14 \pm 1.30$ ; Dieta Polifenoli:  $-0.57 \pm 0.80$ ; Dieta Omega-3 + Polifenoli:  $-0.32 \pm 0.64$  kg) che erano statisticamente significative nel gruppo assegnato alla Dieta Omega-3 ( $p=0.041$ ). La circonferenza della vita non è cambiata significativamente durante l'intervento (Dieta Controllo:  $-0.8 \pm 1.4$ ; Dieta Omega-3:  $-1.1 \pm 1.5$ ; Dieta Polifenoli:  $-0.6 \pm 1.5$ ; Dieta Omega-3 + Polifenoli:  $-1.2 \pm 1.6$  cm).

*Adesione al trattamento dietetico:* L'adesione al trattamento dietetico è stata ottimale in tutti i gruppi sperimentali (Tabella 2). Come atteso, le diete erano differenti esclusivamente per l'indice ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) e il contenuto di polifenoli e acidi grassi  $\omega 3$ . Nessuna differenza è stata riscontrata per macronutrienti, fibre e contenuto di vitamine tra i quattro gruppi alimentari. Tutti i soggetti erano nei limiti di assunzione definiti per una buona conformità per ciascun componente alimentare.

*Metabolismo lipidico - Lipidi e lipoproteine a digiuno:* Dopo 8 settimane le diete ricche in polifenoli, LCn3, o la loro combinazione, sembravano diminuire i trigliceridi a digiuno, rispetto alla dieta di controllo. Tuttavia, l'ANOVA a due fattori ha mostrato che solo l'effetto dei polifenoli era statisticamente significativo ( $p= 0.0023$ ), senza alcun effetto significativo per gli acidi grassi  $\omega 3$  o l'interazione tra i due componenti. Le concentrazioni di colesterolo totale e la frazione LDL non sono state influenzate in maniera significativa dai diversi interventi dietetici. Per quanto riguarda le concentrazioni dei lipidi nelle VLDL grandi e nelle HDL, è stata riscontrata una riduzione significativa sia dei trigliceridi che del colesterolo per effetto dei polifenoli,

senza effetti significativi degli acidi grassi  $\omega 3$  o dell'interazione dei due componenti.  
(Tabella 4).

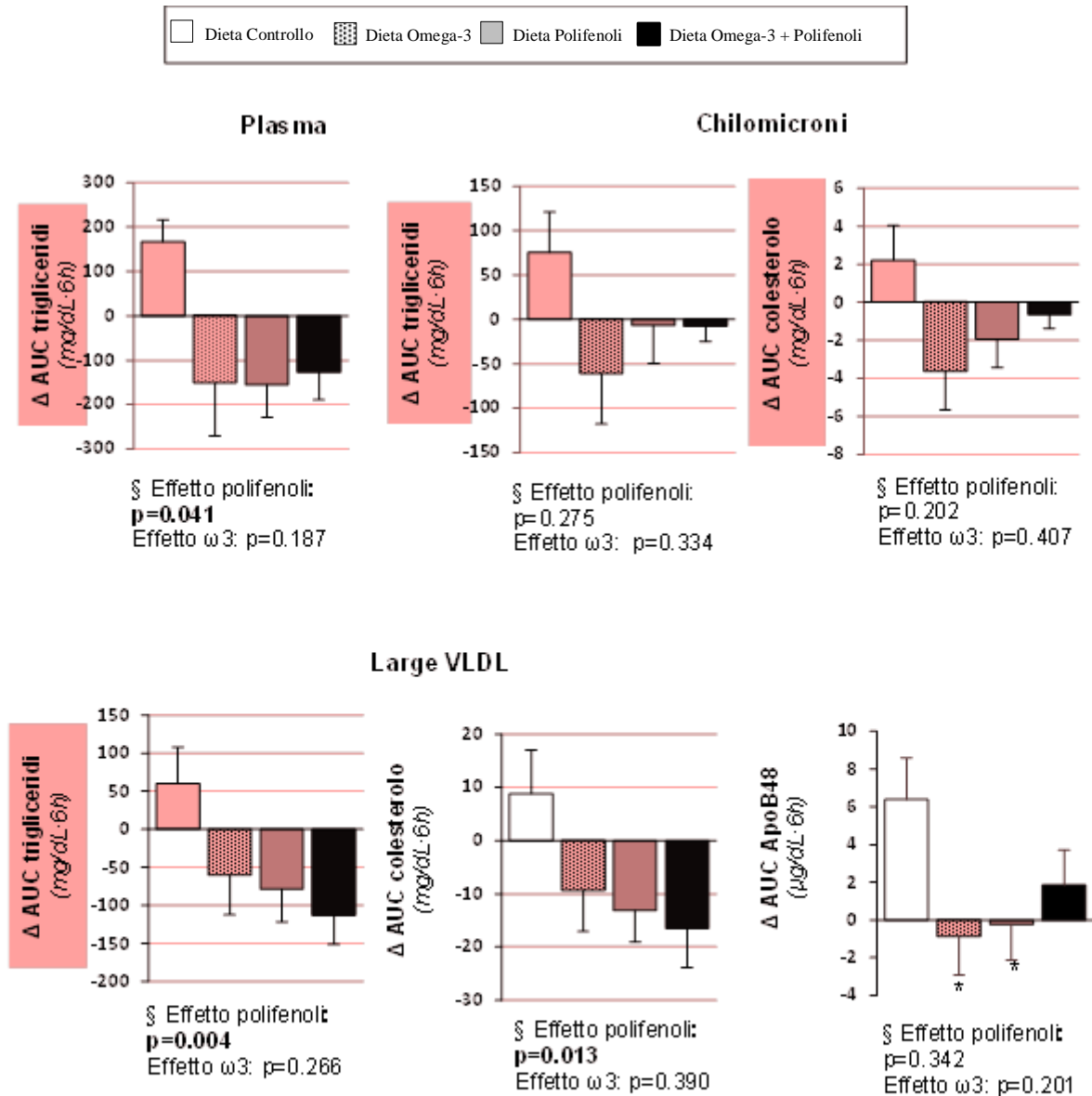
**Tabella 4.** Variazioni assolute di colesterolo, trigliceridi e indici di tolleranza glucidica a digiuno.

	Dieta Controllo	Dieta Omega-3	Dieta Polifenoli	Dieta Omega-3 + Polifenoli	Effetto $\omega 3$ ( <i>p</i> )	Effetto Polifenoli ( <i>p</i> )	Effetto interazione ( <i>p</i> )
<b>Plasma (mg/dl)</b>							
-Trigliceridi	19±49	-14±56	-18±31	-15±40	0.261	<b>0.023</b>	0.095
-Colesterolo	-2±23	-8±21	-9±21	-1±24	0.836	0.859	0.175
<b>VLDL grandi (mg/dl)</b>							
-Trigliceridi	7.2±32.0	-9.4±38.2	-14.8±27.0	-11.9±26.0	0.872	<b>0.016</b>	0.210
-Colesterolo	1.61±6.34	-1.90±7.40	-2.19±4.88	-1.78±4.96	0.821	<b>0.045</b>	0.211
<b>HDL (mg/dl)</b>							
-Trigliceridi	1.35±2.76	-0.58±8.83	-4.60±6.42	-1.42±4.02	0.910	<b>0.017</b>	0.229
-Colesterolo	0.2±3.7	0.4±4.1	-2.4±3.9	-3.5±5.7	0.503	<b>0.005</b>	0.675
<b>LDL-Colesterolo (mg/dl)</b>	-4.07±16.2	-2.06±14.6	-6.50±18.4	5.20±16.4	0.120	0.088	0.835
<b>Glicemia (mg/dl)</b>	104±12	104±12	100±9	103±11	0.819	0.882	0.898
<b>Insulina (<math>\mu</math>U/ml)</b>	17±5	20±7	21±6	17±6	0.861	0.449	0.940
<b>QUICKI</b>	-0.001±0.004	0.001±0.003	-0.002±0.005	-0.001±0.005	0.752	0.804	0.836
<b>HOMA-<math>\beta</math> (%)</b>	-12.26±10.04	-11.52±7.10	-3.17±12.92	-3.36±10.65	0.409	0.979	0.964

*Metabolismo Lipidico - Lipidi e lipoproteine nel periodo postprandiale:* Le variazioni assolute (8 settimane meno basale) della risposta postprandiale dei lipidi e dell'apoB48 osservate dopo l'intervento sono mostrati nella Figura 2. L'AUC dei trigliceridi plasmatici dopo il pasto sembrava diminuire in tutti i gruppi sperimentali. Tuttavia, l'ANOVA a due fattori ha mostrato che solo l'effetto dei polifenoli era statisticamente significativo ( $p=0.041$ ), senza effetti significativi per gli acidi grassi  $\omega 3$  o la loro interazione (Figura 2). L'AUC del colesterolo totale del plasma non si è modificata in modo significativo con nessuna delle diete sperimentali (dati non riportati). Nei chilomicroni, sia l'AUC dei trigliceridi che quella del colesterolo sembravano diminuire dopo la Dieta Omega-3, ma l'ANOVA a due fattori non ha mostrato nessun effetto statisticamente significativo. Nelle VLDL grandi, invece, sia l'AUC dei trigliceridi che quella del colesterolo diminuivano nei gruppi assegnati alle diete ricche in polifenoli. L'ANOVA a due fattori ha mostrato che l'effetto dei polifenoli era statisticamente significativo ( $p=0.004$  e  $p=0.013$ , per trigliceridi ed colesterolo, rispettivamente), senza effetti significativi per gli acidi grassi  $\omega 3$  o l'interazione. Inoltre, l'AUC dell'apoB48 diminuiva significativamente nei gruppi assegnati alla Dieta Omega-3 e la Dieta Polifenoli ( $p < 0.05$  per entrambi vs Dieta Controllo; ANOVA ad una via) con un effetto significativo dell' interazione ( $p = 0.023$ ; ANOVA a due fattori) (Figura 2).



**Figura 2.** Variazioni assolute della risposta lipidica postprandiale nel plasma e nelle frazioni lipoproteiche e della concentrazione di Apo B48.



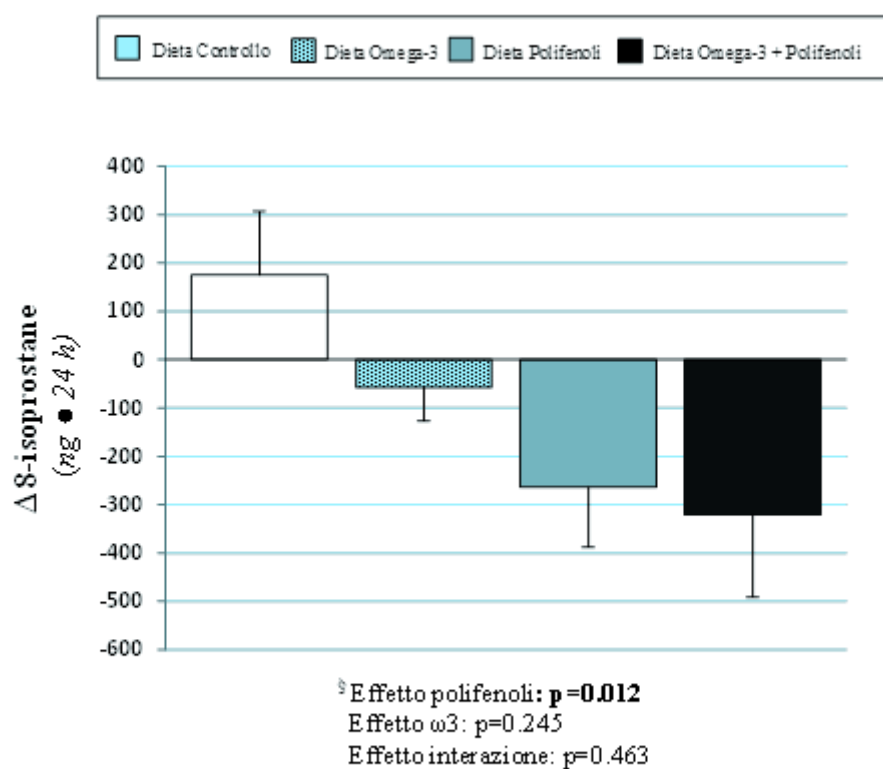
I dati sono espressi come media ±ES.

§ ANOVA a due fattori.

\*p<0.05 vs. Dieta Controllo (ANOVA e LSD *post-hoc* analisi).

*Stress ossidativo:* Al basale, le concentrazioni urinarie di 8-isoprostano erano simili nei quattro gruppi sperimentali (Dieta Controllo:  $1176 \pm 485$ ; Dieta Omega-3:  $1037 \pm 475$ ; Dieta Polifenoli:  $1433 \pm 752$ ; Dieta Omega-3 + Polifenoli:  $1385 \pm 660$  ng/24h; tabella 4). Dopo 8 settimane, le concentrazioni di 8-isoprostano diminuivano nei gruppi assegnati alle diete ricche in polifenoli (Figura 3). L'ANOVA a due fattori ha mostrato un effetto significativo dei polifenoli ( $p=0.012$ ), senza effetti significativi per gli acidi grassi  $\omega 3$  o per l'interazione.

**Figura 3.** Variazioni assolute della concentrazione urinaria di 8-isoprostano.



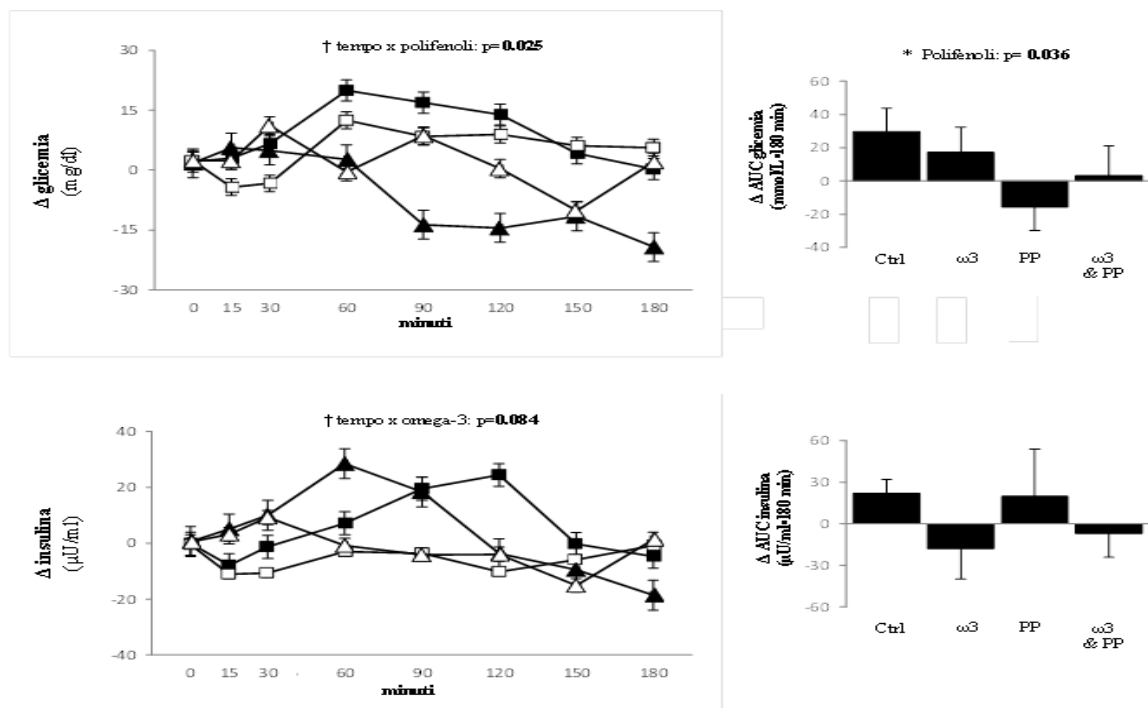
I dati sono espressi come media  $\pm$  ES.

§ ANOVA a due fattori.

*Metabolismo glucidico (OGTT) - Glicemia, insulina e indici a digiuno:* L'intervento di 8 settimane con polifenoli, acidi grassi  $\omega 3$  o la loro combinazione non ha indotto alcuna variazione significativa delle concentrazioni plasmatiche di glucosio e di insulina e degli indici di insulino-sensibilità e capacità di secrezione insulinica.

*Metabolismo glucidico (OGTT) - Glicemia, insulina e indici derivati:* Dopo 8 settimane di intervento, le variazioni assolute della glicemia e dell'insulina carico di glucosio sono riportati in Figura 4, sia come singoli punti temporali sia come AUC. La risposta glicemica diminuiva in modo significativo per effetto dei polifenoli ( $p=0.036$  ANOVA a due fattori), mentre nessun effetto significativo è stato osservato per gli acidi grassi  $\omega 3$  o per l'interazione. Per quanto riguarda la variazione assoluta dell'insulina plasmatica, nessuna differenza significativa è stata riscontrata, sia come singoli punti temporali sia come AUC, tra i gruppi sperimentali (Figura 4).

**Figura 4.** Variazioni assolute della glicemia e dell'insulina durante l'OGTT.



I dati sono espressi come media  $\pm$  ES.

Quadrato nero: Dieta Controllo; Quadrato bianco: Dieta Omega-3; Triangolo bianco: Dieta Polifenoli; Triangolo nero: Dieta Omega-3+Polifenoli.

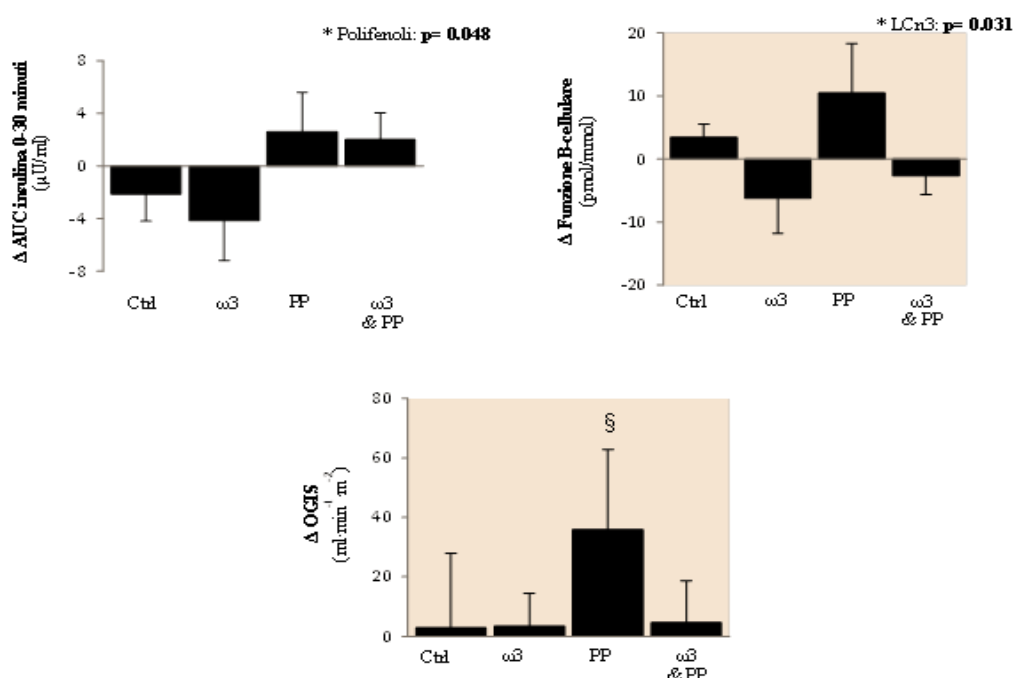
Ctrl: Dieta Controllo;  $\omega 3$ : Dieta Omega-3; PP: Dieta Polifenoli;  $\omega 3$ &PP: Dieta Omega-3+Polifenoli.

†Modello Lineare Generalizzato per misure ripetute

\*ANOVA a due fattori.

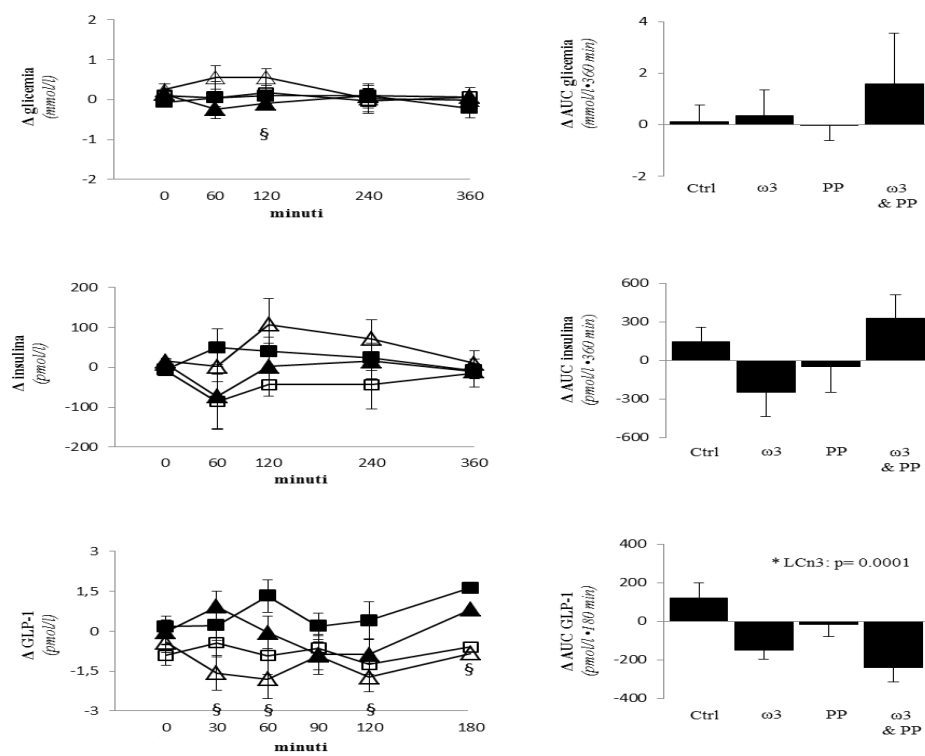
Tuttavia, prendendo in considerazione la fase precoce della secrezione di insulina (AUC 0-30 minuti; Figura 5), è stato riscontrato un aumento nei gruppi che seguivano le diete ricche in polifenoli; l'ANOVA a due fattori ha mostrato un effetto significativo dei polifenoli ( $p=0.048$ ), mentre non vi è stato alcun effetto per gli acidi grassi  $\omega 3$  o la loro interazione. Gli indici OGTT-derivati sono mostrati in Figura 5. Le variazioni assolute della funzione  $\beta$ -cellulare sembravano diminuire nel gruppo assegnato a alle diete ricche in acidi grassi  $\omega 3$  mentre aumentava dopo la Dieta Polifenoli. L'ANOVA a due fattori ha mostrato un effetto significativo degli acidi grassi  $\omega 3$  ( $p=0.031$ ), mentre non sono stati trovati effetti significativi per i polifenoli o l'interazione. Nessun effetto significativo è stato osservato sulle variazioni assolute di insulino-sensibilità, valutata mediante indice OGIS, nei gruppi sperimentali secondo l'ANOVA a due fattori. Tuttavia, nel gruppo assegnato alla Dieta Polifenoli, la sensibilità era aumentata in maniera statisticamente significativa rispetto alla Dieta Controllo ( $p=0.050$  vs Dieta Controllo; *post hoc* ANOVA).

**Figura 5.** Variazioni assolute della secrezione precoce dell'insulina, della funzione beta-cellulare e dell'indice OGIS durante l'OGTT.



*Metabolismo glucidico (Pasto test):* Le variazioni assolute di glicemia, insulina e GLP-1 osservate dopo 8 settimane di intervento sono mostrate in figura 6 , sia come singoli punti temporali che come AUC dopo il pasto test. Per quanto riguarda il profilo glicemico postprandiale, non sono state osservate differenze significative né come profilo né come AUC. Tuttavia, le concentrazioni plasmatiche di glucosio postprandiale tendevano ad aumentare dopo le diete ricche in acidi grassi  $\omega$ 3, raggiungendo la significatività statistica a 120 minuti (Figura 6). La risposta postprandiale dell'insulina aumentava significativamente del gruppo assegnato alla Dieta Omega-3 e Polifenoli, mentre diminuiva nei soggetti assegnati alla Dieta Omega-3 e alla Dieta Polifenoli. Tuttavia l'ANOVA a due fattori non ha mostrato nessun effetto significativo. (figura 6). Infine, le concentrazioni postprandiali di GLP-1 risultavano diminuite per effetto degli acidi grassi  $\omega$ 3 ( $p < 0.001$  ANOVA a due fattori) mentre nessun effetto significativo è stato osservato per i polifenoli o l'interazione (Figura 6).

**Figura 6.** Variazioni assolute della glicemia, dell'insulina e del GLP-1 durante il pasto test.



**Discussione:** I risultati principali e più rilevanti dello studio di intervento sono che una dieta naturalmente ricca di polifenoli, (1) riduce la trigliceridemia, soprattutto nella frazione delle VLDL grandi, a digiuno e in fase postprandiale, (2) diminuisce lo stress ossidativo e (3) migliora la tolleranza glucidica in soggetti ad alto rischio di sviluppare malattie cardiovascolari e diabete.

Le evidenze ad oggi presenti in letteratura sul ruolo dei polifenoli sul metabolismo glico-lipidico derivano soprattutto da studi *in vitro* e sugli animali<sup>102</sup>; i pochi studi condotti nell'uomo hanno utilizzato una singola fonte di polifenoli oppure estratti di un singolo composto fenolico testando, quindi, dosi farmacologiche difficilmente raggiungibili con l'alimentazione abituale. Inoltre, tali studi, forniscono spesso risultati contrastanti. In particolare, per quanto riguarda gli effetti dei polifenoli sul metabolismo lipidico, alcuni studi mostrano solo una tendenza al miglioramento della colesterolemia nella frazione LDL e HDL; inoltre, i dati sul metabolismo dei trigliceridi sono estremamente divergenti<sup>103</sup> e sono molto pochi gli studi che hanno valutato l'effetto dei polifenoli sul metabolismo lipidico postprandiale<sup>104</sup>.

Nello studio, sono diversi i potenziali siti di azione su cui i polifenoli possono agire influenzando il metabolismo lipidico; in particolare, i polifenoli potrebbero aver indotto una riduzione dell'assorbimento dei trigliceridi, con conseguente diminuzione della circolazione di lipoproteine ricche in trigliceridi e, eventualmente, lipoproteine remnant<sup>102</sup>. Altri possibili meccanismi includono un aumento del dispendio energetico, riduzione lipogenesi, massa grassa ridotta, infiammazione ridotta, e la riduzione dello stress ossidativo<sup>105</sup>. A tal proposito, nello studio abbiamo osservato una riduzione di circa il 20% della concentrazione urinaria di 8-isoprostano, un indicatore biologico affidabile di ossidazione, per effetto dei polifenoli. La riduzione dello stress ossidativo potrebbe influenzare il metabolismo lipidico aumentando

l'attività degli enzimi coinvolti nell'ossidazione dei grassi nel fegato, o diminuendo l'assorbimento dei nutrienti<sup>106</sup>. Tuttavia, non è da escludere che il miglioramento del metabolismo lipidico a digiuno e, soprattutto, in fase postprandiale potrebbe aver indotto la riduzione dello stress ossidativo.

Un risultato inaspettato di questo studio è la riduzione del colesterolo e dei trigliceridi nelle HDL osservato dopo l'assunzione di diete ricche in polifenoli. Il significato di questa riduzione in termini di rischio cardiovascolare è sconosciuta. I risultati relativi alla tolleranza glucidica mostrano un miglioramento del metabolismo del glucosio durante l'OGTT e quindi in assenza di una dose acuta di polifenoli. Ciò suggerisce che l'assunzione cronica di polifenoli induce modifiche del metabolismo e dell'espressione di geni coinvolti nella regolazione del metabolismo del glucosio. In particolare, la diminuzione delle concentrazioni di glucosio nel plasma osservate durante l'OGTT era associato con un miglioramento della prima fase della secrezione di insulina. Inoltre, come dimostrato da indici OGTT-derivati, i polifenoli alimentari tendevano a migliorare anche la sensibilità all'insulina post-carico.

Prove da diversi studi in vitro e sugli animali supportano i meccanismi d'azione benefica dei polifenoli sul metabolismo del glucosio osservata nel nostro studio. Infatti, varie classi di polifenoli sono stati in grado di migliorare la secrezione di insulina attraverso meccanismi dipendenti<sup>107</sup> e indipendenti<sup>108</sup> dal glucosio e stimolando la proliferazione delle cellule beta<sup>109</sup>. Inoltre, alcuni studi hanno anche dimostrato che i polifenoli potrebbero migliorare l'assorbimento del glucosio dai tessuti periferici che influenzano direttamente l'azione di geni chiave come il PPAR-gamma e la traslocazione del trasportatore di glucosio-GLUT-4, come mostrato in adipociti in coltura<sup>110</sup>.



In questo studio di intervento, l'uso di diverse classi di polifenoli, ciascuno con un possibile meccanismo di azione diverso sul metabolismo del glucosio, può spiegare l'influenza simultanea su diversi meccanismi, la secrezione di insulina prima fase e la sensibilità all'insulina con conseguente effetto additivo e chiaramente benefico sulla tolleranza al glucosio. Gli effetti benefici di diete alte in polifenoli sul metabolismo del glucosio osservata durante OGTT non erano evidenti dopo un pasto con la stessa composizione della dieta seguita. È possibile che i pasti poveri in carboidrati e ricchi di grassi – elaborati ad hoc per la valutazione della lipemia postprandiale – non fossero adeguati per osservare nella risposta glicemica postprandiale.

Un punto di forza dello studio è che le diete sperimentali differivano esclusivamente per contenuto di acidi grassi  $\omega 3$  e polifenoli mentre erano sovrapponibili per contenuto di macro e micronutrienti, fattori che avrebbero potuto influenzare gli effetti studiati. Inoltre, gli effetti osservati nello studio non erano mediati da variazioni del peso corporeo o modifiche dell'appetito, come suggerito per le catechine, o per lo più legati agli effetti adrenergici della caffeina<sup>111</sup>. Infatti, il peso corporeo è rimasto invariato durante il protocollo sperimentale, e la presenza di caffeina era trascurabile perché sono stati impiegati caffè e tè decaffeinato. Pertanto, possiamo affermare con sicurezza che il miglioramento degli *outcome* da noi valutati è legata principalmente alla maggiore assunzione di polifenoli<sup>112</sup>.

Un altro punto di forza è che la quantità di polifenoli utilizzate nel nostro studio è più elevato rispetto alla quantità generalmente consumata nelle diete occidentali (1g/die), ma facilmente raggiungibile con cibi naturali, tipici della maggior parte delle abitudini gastronomiche e senza alcun tipo di supplemento. Inoltre, l'ottima aderenza dei partecipanti mostra che questo tipo di dieta è fattibile e facilmente accettabile. Un ulteriore punto di forza del nostro studio controllato è stato che le diete sperimentali

differivano in particolare nei due componenti che abbiamo cercato di valutare, cioè polifenoli e LCn3.

Un limite di questo studio è che i risultati si riferiscono a soggetti caratterizzati da un alto rischio cardio-metabolico; quindi, non sappiamo se gli stessi risultati possono essere applicati anche ad una popolazione senza alterazioni metaboliche o con stadi più avanzati di malattia metabolica o cardiovascolare.

I risultati di questo studio sono importanti perché le alterazioni del metabolismo glico-lipidico a digiuno e in fase postprandiale rappresentano dei fattori di rischio cardiovascolare indipendente. La dieta è l'approccio più naturale per alterazioni postprandiali e, grazie alla sua azione pleiotropica, può esplicare effetti benefici multipli. Lo stress ossidativo è uno dei possibili meccanismi coinvolti nella patogenesi delle principali malattie degenerative croniche. La possibilità di agire favorevolmente su questo meccanismo con una dieta naturalmente ricca di differenti polifenoli è clinicamente rilevante.

In conclusione, questo studio randomizzato e controllato fornisce la prova che le diete naturalmente ricche in polifenoli riducono la trigliceridemia postprandiale e lo stress ossidativo; inoltre, migliorano la tolleranza glucidica, riducendo la glicemia, aumentando la secrezione precoce dell'insulina e l'insulino-sensibilità periferica.

Questi effetti possono contribuire a spiegare l'associazione favorevole tra l'assunzione di polifenoli con la dieta e la riduzione del rischio di diabete e malattia cardiovascolare.

*7.2 Tematica 2 - Valutazione delle abitudini alimentari in pazienti con diabete tipo 2 e relazione con lo stato di salute (controllo glicemico, profilo di rischio cardiovascolare, infiammazione subclinica): Progetto TOSCA.IT (pubblicazione n. 5, 8-9, 21, 26-27, 29, 31-32)*

**Introduzione:** Nelle persone con diabete tipo 2 la terapia dietetica è molto importante per il mantenimento di un buon controllo glicemico e per la prevenzione delle complicanze micro- e macro-vascolari. In molti Paesi dell'Unione Europea i consigli dietetici per la popolazione diabetica si basano sulle raccomandazioni del Gruppo di Studio "Diabete e Nutrizione" (DNSG) della Società Europea per lo Studio del Diabete (EASD)<sup>113</sup>. In Italia tali raccomandazioni nutrizionali sono state largamente riprese dalle Società Diabetologiche SID (Società Italiana di Diabetologia) e AMD (Associazione Medici Diabetologi) per l'elaborazione degli "Standard Italiani per la Cura del Diabete Mellito"<sup>114</sup>. Nonostante gli sforzi per diffondere e implementare queste raccomandazioni, la loro applicazione nella pratica clinica è ancora largamente insufficiente, come documentato da diversi studi<sup>115-121</sup>. Le ragioni sono molteplici; certamente tra queste va considerato il fatto che le abitudini alimentari anche nei pazienti con diabete risentono molto delle tradizioni gastronomiche locali. Da questo punto di vista, l'Italia, caratterizzata da forti e radicate tradizioni gastronomiche con notevoli differenze regionali, rappresenta un modello interessante per studiare l'impatto dell'ambiente sull'implementazione delle raccomandazioni nutrizionali nei pazienti con diabete.

**Obiettivi:** Valutare le abitudini alimentari delle persone con diabete in tre macro-aree geografiche italiane, nord, centro e sud, per studiare in che misura le tradizioni

gastronomiche locali possono influenzare l'adesione alle raccomandazioni nutrizionali. Valutare, inoltre, la relazione tra il consumo di grassi e carboidrati ed il profilo metabolico di tali pazienti.

**Partecipanti:** Hanno partecipato allo studio 1786 uomini e donne con diabete di tipo 2, di età compresa tra 50 e 75 anni, arruolati in 57 centri per la cura del diabete distribuiti in tutta l'Italia nell'ambito dello studio TOSCA.IT (Thiazolidinediones Or Sulfonylureas and Cardiovascular Accidents Intervention Trial)<sup>122</sup>. I criteri di inclusione sono indice di massa corporea (IMC)  $\geq 20$  e  $< 45$  kg/m<sup>2</sup>, emoglobina glicata (HbA1c)  $> 7\%$  e  $\leq 9\%$ , terapia con ipoglicemizzanti orali. Sono stati esclusi i pazienti con storia di eventi cardiovascolari nei precedenti 3 mesi, creatininemia  $> 1.5$  mg/dl, gangrena, scompenso cardiaco, severa epatopatia, uso di glucocorticoidi, neoplasie, tossicodipendenza o problemi che interferissero con l'adesione al protocollo di studio.

**Metodi:** Per tutti i pazienti sono stati misurati peso, altezza e circonferenza vita secondo protocollo standard. La valutazione delle abitudini alimentari è stata effettuata mediante la versione italiana del questionario EPIC (European Prospective Investigation on Cancer and Nutrition), un questionario alimentare semiquantitativo di frequenza validato<sup>123</sup> e utilizzato in molti studi epidemiologici. Ai partecipanti era richiesto di indicare la frequenza di consumo di ciascun alimento assunto negli ultimi 12 mesi e la quantità consumata, servendosi dell'aiuto di immagini rappresentanti diverse porzioni dello stesso alimento (Figure 1 e 2). L'apporto di nutrienti è stato calcolato usando un software elaborato ad hoc, sulla base della "Banca dati di composizione degli alimenti" dell'Istituto Europeo di Oncologia<sup>124</sup> e delle "Tabelle di

composizione degli alimenti” dell’Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN)<sup>96</sup>. Per quanto riguarda indice e carico glicemico, sono state utilizzate le “International Table of Glycemic Index and Glycemic Load Values”<sup>125</sup>.

**Figura 1.** Esempio di domanda sulla frequenza di consumo degli alimenti

**PRIMI PIATTI ASCIUTTI**

Pensi sia al pranzo che alla cena

12 ► Normalmente quante volte mangia un PRIMO PIATTO DI PASTA o RISO (escluso le minestre in brodo)?

N. volte alla settimana  oppure N. volte al mese  oppure N. volte all'anno  oppure Mai ☐

COME COMPILARE  
COSÌ NON COSÌ

Non scrivere mai. Zema riservata all'ufficio.

13 ► Normalmente che tipo di PRIMO PIATTO ASCIUTTO mangia? (risponda in ogni riga annerendo un cerchietto):

	mai o quasi	qualche volta	circa metà delle volte	il più delle volte	tutte le volte
13 ► PASTASCIUTTA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
14 ► PASTA ALL'UOVO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
15 ► PASTA RIPIENA o AL FORNO (Tortellini, Cannelloni, Ravioli, Lasagne)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
16 ► RISO e RISOTTI	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

**Figura 2.** Esempio di immagini rappresentanti diverse porzioni dello stesso alimento



**Analisi statistica:** I dati sono espressi come media e deviazione standard ( $M \pm DS$ ), oppure come %. Il confronto tra medie è stato effettuato con l’analisi della varianza e il test post hoc. Il confronto tra proporzioni è stato effettuato con il test del chi quadro. Un valore di  $p < 0.05$  (due code) è stato considerato statisticamente significativo. L’analisi è stata eseguita con il software SPSS 15.0 per Windows.

**Risultati:** Sono stati analizzati i questionari alimentari di 1786 partecipanti, 1035 uomini e 751 donne. Il contenuto medio in energia della dieta non mostra differenze

tra le 3 aree geografiche considerate; tuttavia, gli alimenti che contribuiscono alla composizione della dieta sono diversi a seconda della locazione geografica.

Per quanto riguarda il consumo di alimenti ricchi in grassi e/o proteine (Tabella 1), il sud presenta un consumo significativamente più basso di alimenti ricchi in grassi saturi, quali carne, salumi e grassi animali, e un consumo significativamente più elevato di pesce rispetto sia al nord sia al centro ( $p<0.05$ ). Inoltre, sia il sud sia il nord presentano un consumo significativamente più alto di prodotti caseari rispetto al centro ( $p<0.05$ ). Per quanto riguarda gli oli vegetali, al sud c'è un consumo significativamente più alto di olio d'oliva e significativamente più basso di oli di semi rispetto al nord ( $p<0.05$ ).

**Tabella 1.** Consumo (grammi/die) di Alimenti ricchi in Grassi e/o Proteine nelle diverse aree geografiche

<b>Alimenti (grammi/giorno)</b>	<b>Nord</b>	<b>Centro</b>	<b>Sud</b>
<b>Carne</b>	107.4±60.8	112.9±61.9	99.1±52.5°•
<b>Salumi</b>	15.8±17.1	16.5±15.5	13.8±13.5°•
<b>Pesce</b>	35.7±25.7	39.8±28.8°	45.5±31.2°•
<b>Prodotti Caseari</b>	39.8±31.6	33.2±25.8°	37.0±27.6°•
<b>Uova e Frattaglie</b>	19.1±15.8	22.1±15.7°	21.2±14.6°
<b>Olio d'Oliva</b>	21.1±12.4	23.0±12.0°	22.5±12.0°
<b>Olio di Semi</b>	3.4±5.6	3.4±6.1	2.0±4.0°•
<b>Grassi Animali</b>	2.9±4.3	3.1±3.6	2.0±2.2°•

M±DS

°  $P<0.05$  vs Nord    •  $P<0.05$  vs Centro

Per quanto riguarda il consumo di alimenti ricchi in carboidrati (Tabella 2), al sud è significativamente più elevato l'apporto di alimenti ricchi in fibre vegetali, quali pane integrale e legumi, rispetto al nord e al centro ( $p<0.05$ ). Inoltre, nelle regioni del sud c'è un apporto significativamente più basso di alimenti amidacei ad alto indice glicemico (IG), quali cereali e tuberi, e significativamente più alto di frutta rispetto al

centro ( $p<0.05$ ). Il consumo di bevande zuccherate è significativamente più basso al sud e al centro rispetto al nord ( $p<0.05$ ). Non sono state osservate differenze geografiche per il consumo di pizza, verdure e zuccheri aggiunti.

**Tabella 2.** Consumo (grammi/die) di Alimenti ricchi in Carboidrati nelle diverse aree geografiche

<b>Alimenti (grammi/giorno)</b>	<b>Nord</b>	<b>Centro</b>	<b>Sud</b>
<b>Cereali e Tuberi</b>	178.7±96.3	217.2±123.5°	186.6±107.6•
<b>Pane Integrale</b>	13.1±30.1	12.1±31.3	17.9±35.5°•
<b>Pizza</b>	20.7±21.1	21.5±21.3	22.4±20.4
<b>Legumi</b>	68.4±59.4	74.9±76.3	95.7±65.7°•
<b>Verdure</b>	171.5±101.7	178.5±102.4	171.6±99.7
<b>Frutta</b>	322.2±185.1	270.9±158.3°	334.2±195.2•
<b>Zuccheri Aggiunti</b>	7.4±12.6	7.2±11.2	7.7±15.4
<b>Bevande Zuccherate</b>	44.6±125.9	31.4±121.5°	30.8±66.1°

M±DS

°  $P<0.05$  vs Nord    •  $P<0.05$  vs Centro

Queste differenze nelle scelte degli alimenti si traducono in una differente composizione in nutrienti della dieta nelle diverse aree geografiche, come mostrato nella Tabella 3. A parità di apporto calorico, il sud presenta un consumo significativamente più basso di grassi totali, saturi e polinsaturi rispetto al centro e al nord ( $p < 0.05$ ). Il consumo di colesterolo e grassi monoinsaturi, invece, non mostra differenze significative tra le 3 aree geografiche. Per quanto riguarda i carboidrati, il sud e il centro presentano un consumo significativamente più alto rispetto al nord di carboidrati totali e amido ( $p<0.05$ ), mentre il consumo di fibra, pur essendo generalmente basso, è significativamente più alto al sud rispetto sia al nord sia al centro ( $p<0.05$ ). Inoltre, il centro presenta un consumo significativamente più alto di carboidrati totali, amido e solubili rispetto al nord ( $p<0.05$ ). L'IG medio della dieta non è significativamente diverso tra le tre aree geografiche.

**Tabella 3.** Composizione in Nutrienti della Dieta nelle diverse aree geografiche

	<b>Nord</b>	<b>Centro</b>	<b>Sud</b>
<b>Energia (Kcal)</b>	1872.1±680.1	1957.5±668.2	1882.2±668.1
<b>Proteine (% calorie totali)</b>	18.3±2.6	18.2±2.5	18.1±2.4
<b>Lipidi (% calorie totali)</b>	37.4±6.1	36.2±6.4°	36.2±5.7°
<b>Saturi (% calorie totali)</b>	12.5±2.6	11.7±2.4°	12.0±2.4°
<b>Monoinsaturi (% calorie totali)</b>	18.1±3.9	17.9±4.0	17.7±3.5
<b>Polinsaturi (% calorie totali)</b>	4.6±1.2	4.4±1.1°	4.3±0.9°
<b>Colesterolo (mg)</b>	321.3±144.1	330.5±140.3	320.4±129.9
<b>Carboidrati (% calorie totali)</b>	44.2±7.4	45.6±7.5°	45.6±6.8°
<b>Amido (% calorie totali)</b>	27.2±8.0	30.4±8.6°	28.4±7.8°•
<b>Solubili (% calorie totali)</b>	17.0±5.7	15.1±5.2°	17.1±5.2°•
<b>Fibra (g/die)</b>	18.4±6.8	18.8±6.6	20.6±7.8°•
<b>Fibra (g/1000 Kcal)</b>	10.5±2.5	10.3±2.4	11.6±2.9°•
<b>Indice Glicemico (%)</b>	51.6±3.3	52.0±3.7	51.6±3.2
<b>Alcool (g)</b>	11.4±15.3	12.2±16.5	9.3±14.2°•

M±DS

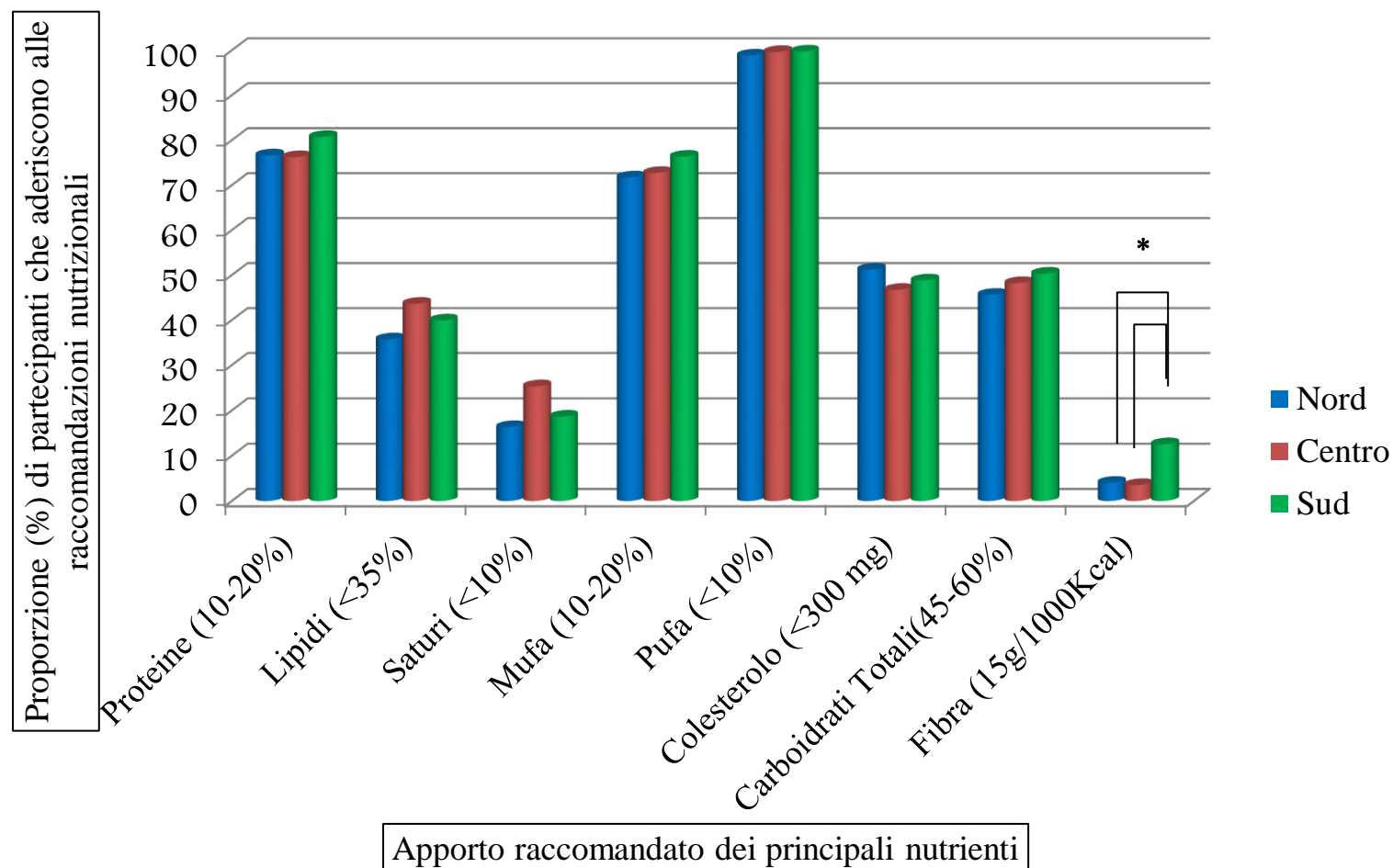
° P&lt;0.05 vs Nord    • P&lt;0.05 vs Centro

Abbiamo, quindi, valutato la coerenza delle abitudini alimentari dei partecipanti allo studio con le indicazioni delle linee guida nutrizionali per le persone con diabete. In Figura 3 è riportata la proporzione di persone con abitudini alimentari in linea con le raccomandazioni nutrizionali nelle tre aree geografiche. L'adesione non presenta differenze significative nelle tre aree geografiche per quanto riguarda il consumo di proteine, acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi, e zuccheri solubili. È molto scarsa per il consumo di fibra, particolarmente al nord e al centro (rispettivamente il 4.0%, 3.5% e 12.5% della popolazione diabetica del nord, centro e sud segue le indicazioni delle linee guida sul consumo di fibra alimentare, mentre la restante parte ne consuma meno di quanto raccomandato). L'adesione è scarsa anche per il consumo di grassi saturi che mediamente eccede i livelli consigliati (rispettivamente il 16.3%, 25.3% e 18.6% della popolazione diabetica del nord, centro e sud segue le indicazioni



delle linee guida sul consumo di grassi saturi, mentre la rimanente parte consuma una quantità più elevata di quella raccomandata).

**Figura 3.** Proporzione (%) di partecipanti con abitudini alimentari coerenti con le raccomandazioni dietetiche (DNSG 2004 e AMD/SID 2010) per i principali nutrienti nelle diverse aree geografiche



\* P<0.05 vs Nord e Centro

Per quanto riguarda, invece, la relazione tra le abitudini alimentari, con particolare riferimento a grassi e carboidrati, ed il profilo metabolico, un aumento del consumo di grassi dal 25 al 35% si associa con un significativo incremento del colesterolo-LDL, trigliceridi, HbA1c e PCR ( $p<0.05$ ); un intake di carboidrati dal 45 al 60% si associa, invece, con una significativa riduzione dei trigliceridi, HbA1c e PCR ( $p<0.05$ ). Spostando l'attenzione sulla qualità dei carboidrati, il consumo di fibra si associa con un migliore profilo metabolico e più bassi livelli di HbA1c e PCR; il contrario si osserva, invece, per gli zuccheri aggiunti.

**Discussione e conclusioni:** I risultati dello studio mettono in evidenza che, nonostante le raccomandazioni nutrizionali siano in teoria le stesse per tutti i pazienti diabetici, nella realtà clinica le abitudini alimentari delle persone con diabete presentano differenze rilevanti a seconda dell'area geografica di residenza. Le differenze sono particolarmente evidenti tra nord e sud Italia, con il centro che spesso si colloca in una posizione intermedia. In particolare, i pazienti diabetici delle regioni del nord tendono a consumare più grassi, specialmente grassi saturi, e meno carboidrati e fibra rispetto ai pazienti residenti al sud. Ciò è giustificato dalle diverse scelte alimentari che vengono effettuate dai pazienti residenti nelle diverse aree geografiche e che sono probabilmente influenzate fortemente, anche nelle persone con diabete, dalle tradizioni gastronomiche locali. In particolare, al nord si osserva un consumo più elevato di carne, salumi e grassi animali, rispetto al sud dove si consumano più spesso pesce e alimenti ricchi in carboidrati che sono allo stesso tempo anche ricchi di fibre (quali legumi, frutta e pane integrale), per cui mediamente il maggior consumo di carboidrati al sud non si traduce in un aumento dell'indice glicemico e del carico glicemico della dieta. Lo studio documenta, inoltre, un'adesione

generalmente scarsa dei pazienti diabetici alle raccomandazioni nutrizionali; le raccomandazioni più disattese sono quelle che riguardano il consumo di fibre e di grassi saturi. Una proporzione molto bassa di pazienti (4.0, 3.5 e 12.5% rispettivamente del nord, centro e sud Italia) consuma almeno 15 g/1000 kcal di fibre come raccomandato. Per quanto riguarda gli acidi grassi saturi, la maggioranza dei pazienti (83.7, 74.7 e 81.4% rispettivamente del nord, centro e sud Italia) consuma una quantità superiore a quella raccomandata. Interessante è anche notare che la quantità di zuccheri semplici assunti quotidianamente dai pazienti diabetici non mostra importanti differenze tra le varie aree geografiche e il suo consumo è abbastanza conforme alle raccomandazioni nutrizionali. Differenti, però, sono gli alimenti che contribuiscono alla quantità di zuccheri semplici assunti; infatti, mentre al sud è la frutta l'alimento che influisce maggiormente sulla quantità di zuccheri semplici, al nord, invece, c'è un maggior consumo di bevande zuccherate. Una scarsa adesione alle raccomandazioni dietetiche nei pazienti con diabete in Italia era già stata documentata in uno studio condotto circa 10 anni addietro su una casistica meno numerosa e con una distribuzione regionale meno rappresentativa della realtà assistenziale italiana. I dati del presente lavoro confermano e rafforzano questo dato e dimostrano inoltre che, nonostante gli sforzi compiuti in questi anni per diffondere e implementare le linee guida nutrizionali nelle persone con diabete, non sono stati compiuti apprezzabili progressi nella pratica clinica. Anzi, c'è da sottolineare che l'apporto di grassi saturi è complessivamente aumentato (dal  $10 \pm 3\%$  dello studio precedente al  $12.1 \pm 2.5\%$  del nostro studio) a dimostrazione che nella popolazione diabetica italiana c'è un trend verso un maggior consumo di grassi saturi in parallelo con quanto si osserva nella popolazione non diabetica<sup>126-127</sup>. La scarsa adesione alle raccomandazioni nutrizionali per il trattamento del diabete da parte dei pazienti è

una problematica che riguarda non solo l'Italia, ma anche altri Paesi europei ed è, almeno in parte, dovuta alla difficoltà delle persone a cambiare le abitudini di vita<sup>115-118</sup>. A questo riguardo una strategia di educazione alimentare che tenga conto delle tradizioni gastronomiche locali, oltre che delle linee guida, potrebbe avere maggiori probabilità di successo.

In conclusione, sebbene al giorno d'oggi sia evidente come un'alimentazione adeguata che risponda alle linee guida rappresenti uno dei cardini nella terapia del diabete, una buona adesione alle raccomandazioni dietetiche per il trattamento del diabete risulta ancora lontana. È necessario mettere in atto strategie di educazione alimentare che possano migliorare l'implementazione delle linee guida nutrizionali ed in particolare ridurre l'apporto di acidi grassi saturi e aumentare il consumo di fibre, i due punti di forza della dieta mediterranea, almeno quella di alcuni decenni fa. Una strategia di educazione alimentare che tenga conto delle tradizioni gastronomiche locali potrebbe migliorare l'adesione dei pazienti diabetici alle raccomandazioni dietetiche.

*7.3 Tematica 3 - Adesione al modello alimentare Mediterraneo: sviluppo di un questionario di frequenza per valutare in modo semplice e rapido l'adesione a tale modello e screening su popolazione per la valutazione dei fattori che influiscono sull'adesione a tale modello: Progetto MEDIQUEST (pubblicazione n. 6-7, 25)*

**Introduzione:** La valutazione dell'adesione al modello alimentare Mediterraneo ha ricevuto un'attenzione crescente negli ultimi anni per gli effetti benefici di tale pattern su vari aspetti della salute dell'uomo<sup>128-140</sup>. Infatti, sono stati proposti diversi indici per la valutazione dello score di adesione al modello Mediterraneo, come Healthy Eating Index, Diet Quality Index, Mediterranean diet score. Tra essi, il Mediterranean diet score di Trichopoulou et al. del 1995 è quello che ha ricevuto maggiore attenzione e utilizzo<sup>76</sup>. Tale strumento è, però, basato su una valutazione quantitativa e tiene in considerazione il valore della mediana di consumo alimentare specifico della popolazione studiata, non consentendo di confrontare gli score ottenuti da popolazioni con differenti abitudini alimentari.

Eppure, nonostante i benefici ampiamente dimostrati, i paesi del Sud-Europa, nei quali la dieta Mediterranea ha avuto origine, ed in particolare la popolazione italiana, si stanno rapidamente allontanando da questo modello, orientando le loro scelte alimentari verso un elevato consumo di cereali raffinati, grassi saturi, zuccheri, carni rosse e processate, tutti alimenti tipici della dieta Nord-americana<sup>141-153</sup>. I motivi di tale allontanamento possono essere diversi; sicuramente, i fattori socio-economici sono diventati i principali determinanti dell'adesione a tale modello alimentare. Il costo della dieta Mediterranea, infatti, sembra aver condotto le persone a rinunciare ad essa in favore di prodotti alimentari meno costosi e non salutari. Ma diversi altri

fattori, oltre a quelli socio-economici, condizionano le abitudini e le scelte alimentari della popolazione.

**Obiettivi:** 1- Validare, in un campione di soggetti sani, un questionario di frequenza semplificato per valutare lo score di adesione al modello alimentare Mediterraneo in modo rapido e utilizzabile in studi epidemiologici che coinvolgono diverse popolazioni. 2- Valutare lo score di adesione alla dieta Mediterranea da parte di un campione di soggetti non selezionati della popolazione Campana. 3- Valutare quali sono i principali fattori che influiscono sull'adesione a tale modello, prendendo in esame i fattori socio-demografici, economici, culturali, antropometrici e le caratteristiche dello stile di vita.

**Metodi: Studio di Validazione**

*Partecipanti:* Hanno partecipato allo studio 138 soggetti sani di entrambi i sessi, età compresa tra 18-60 anni e con Indice di Massa Corporea  $<30 \text{ kg/m}^2$ . I criteri di esclusione erano: presenza di cancro, malattie cardiovascolari, diabete, dislipidemie, ipertensione, malattie gastrointestinali, renali o epatiche, gravidanza e allattamento. I partecipanti sono stati reclutati presso le Università di Napoli e Potenza tra il 2012-2013.


*Validazione MediQuest:* Il MediQuest (Mediterranean Questionnaire) è un questionario di frequenza alimentare composto da 9 domande inerenti la frequenza di consumo sia di alimenti considerati caratteristici della dieta Mediterranea, come prodotti a base di cereali integrali, legumi e/o frutta secca, pesce, olio di oliva, frutta, ortaggi e vino, sia di alimenti tipici della dieta Nord-americana, come carne (inclusa

quella processata) e alimenti ricchi in grassi animali, come prodotti caseari, burro, pancetta, panna, torte e dolci (Figura 1). Ogni domanda prevede 3 risposte (a, b, c) e 3 punteggi (1, 0.5, 0): alla risposta **a** corrisponde come punteggio 1, alla risposta **b** corrisponde 0.5 e alla risposta **c** corrisponde 0. Per gli alimenti tipici della dieta Mediterranea è assegnato come punteggio “1” se la frequenza di consumo è alta e “0” se è bassa. Per gli alimenti tipici della dieta Nord-americana è assegnato come punteggio “1” se la frequenza di consumo è bassa e “0” se è alta. Quando la frequenza di consumo degli alimenti è intermedia è assegnato come punteggio “0.5” sia per gli alimenti Mediterranei che per quelli Nord-americani. La somma di tutti i valori fornisce uno score di Mediterraneità che varia da 0 (in caso di adesione minima, se tutte le risposte sono **c**) a 9 (in caso di adesione massima, se tutte le risposte sono **a**). Lo score ottenuto può rientrare in una delle 4 categorie di adesione: 8-9 (alta), 6-7 (soddisfacente), 4-5 (intermedia), 0-3 (bassa). Il questionario rappresenta non solo uno strumento informativo, ma anche un presidio utile per l’educazione nutrizionale. Infatti, per ciascuna categoria di adesione erano svelati una serie di suggerimenti volti a modificare ciascuno dei comportamenti che contrastavano con quelli ritenuti caratteristici dell’alimentazione Mediterranea.

Tutti i partecipanti erano invitati a compilare anche un questionario di frequenza semiquantitativo composto da 137 domande, a partire dal quale veniva calcolato lo score di adesione alla Dieta Mediterranea secondo il Mediterranean diet score di Trichopoulou et al. Anche in questo caso, il range di score possibili variava da 0 a 9.



**Figura 1.** Esempio di domanda del MediQuest

<b><u>SCOPRI QUANTO E' MEDITERRANEA LA TUA ALIMENTAZIONE: COMPILA IL MEDIQUEST</u></b>	
	<p><b>Quante volte a settimana consumi cereali integrali (pane, pasta, crackers, fette biscottate, etc...)?</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Almeno 3 volte a settimana</li><li>b. 1-2 volte a settimana</li><li>c. Meno di 1 volta a settimana</li></ul>

**Metodi:** **Studio di Adesione**

*Partecipanti:* Hanno partecipato allo studio 411 soggetti sani, di entrambi i sessi, età superiore o uguale a 18 anni. Essi sono stati reclutati presso il Centro Commerciale “Quarto Nuovo” di Quarto (provincia di Napoli), la Galleria “Le Eccellenze Campane” di Napoli e gli uffici degli enti pubblici di Napoli e provincia nel periodo Maggio-Luglio 2014.

*Valutazioni:* Tutti i partecipanti allo studio hanno compilato, in modo anonimo, due questionari: il MediQuest, per valutare lo score di adesione alla dieta Mediterranea, ed un questionario per ottenere le informazioni sui principali fattori che possono influire sull'adesione a tale modello (parametri antropometrici, fattori socio-demografici, economici, culturali e stato di salute). Più in dettaglio, le informazioni presenti nel secondo questionario erano le seguenti: sesso, età, titolo di studio, attività lavorativa, reddito lordo, dimensione della città di residenza, composizione del nucleo familiare, stato civile, abitudine al fumo, numero di pasti giornalieri, consumo abituale di vino e/o alcolici, abitudine alla lettura dell'etichetta nutrizionale, stile di vita, conoscenze nutrizionali, presenza di diabete, dislipidemie, ipertensione, malattie cardiovascolari, malattie neoplastiche.

**Analisi Statistica:** Per lo studio di validazione, la relazione tra lo score ottenuto con il MediQuest e quello ottenuto con il questionario di frequenza è stato ottenuto tramite il coefficiente di correlazione di Spearman. Inoltre, il grado di concordanza tra i due metodi è stato analizzato tramite il coefficiente di correlazione interclasse (ICC) ed il Bland-Altman plot. È stata anche calcolata la percentuale di soggetti che hanno ottenuto lo stesso score con i due metodi.

Per lo studio di adesione, le caratteristiche antropometriche della popolazione e lo score di Meditteraneità sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard (M $\pm$ DS). Il confronto tra medie è stato effettuato tramite l'analisi della varianza (ANOVA) e il test-t per campioni indipendenti.

Tutte le valutazioni statistiche sono state eseguite con il software SPSS 21.0 per Windows. Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.

### **Risultati: Studio di Validazione**

I valori dello score di adesione al modello alimentare Mediterraneo ottenuti con il MediQuest ed il questionario di frequenza erano, rispettivamente,  $4.9 \pm 1.5$  e  $5.7 \pm 1.4$  con una differenza tra i due score pari a -0.79. Il coefficiente di correlazione di Spearman mostrava un valore pari a 0.513 ( $P < 0.05$ ) per gli score totali ottenuti con i due metodi; per i singoli alimenti, il coefficiente di correlazione mostrava valori nel range 0.145 - 0.569 (Tabella 1). In particolare, il coefficiente più alto era assegnato al pesce (0.569) e al vino (0.543); il più basso, invece, ai grassi animali (0.145) e ai cereali (0.110) (Tabella 1). Inoltre, il 74.7% dei partecipanti allo studio ricevevano lo stesso score con entrambi i metodi, con un range di congruenza da 55.8% per i grassi animali al 91.3% per i legumi e l'olio di oliva (Tabella 1).

**Tabella 1.** Coefficienti di correlazione di Spearman e percentuale di soggetti che, per ciascuna domanda, ricevono lo stesso score con entrambi i metodi

	Coefficiente di Correlazione di Spearman	Stesso Score con entrambi i metodi (%)
<b>Cereali</b>	0.110*	57.3
<b>Legumi</b>	0.202*	91.3
<b>Pesce</b>	0.569**	83.3
<b>Carne</b>	0.281**	63.0
<b>Olio d'Oliva</b>	0.274**	91.3
<b>Grassi Animali</b>	0.145*	55.8
<b>Frutta</b>	0.414**	76.1
<b>Vegetali</b>	0.403**	71.8
<b>Vino</b>	0.543**	82.5
<b>Score Totale</b>	0.513*	74.7

\* P<0.05, \*\* P<0.01, Spearman's Correlation Test

### **Risultati: Studio di Adesione**

I partecipanti allo studio (411 soggetti, di cui il 54% donne) avevano un'età pari a 41.0±14.8 anni, un Indice di Massa Corporea pari a 25.3±4.2 kg/m<sup>2</sup> ed uno score medio di adesione al modello alimentare Mediterraneo pari 5.1±1.3. Nessuna differenza si osservava tra uomini e donne per le caratteristiche considerate.

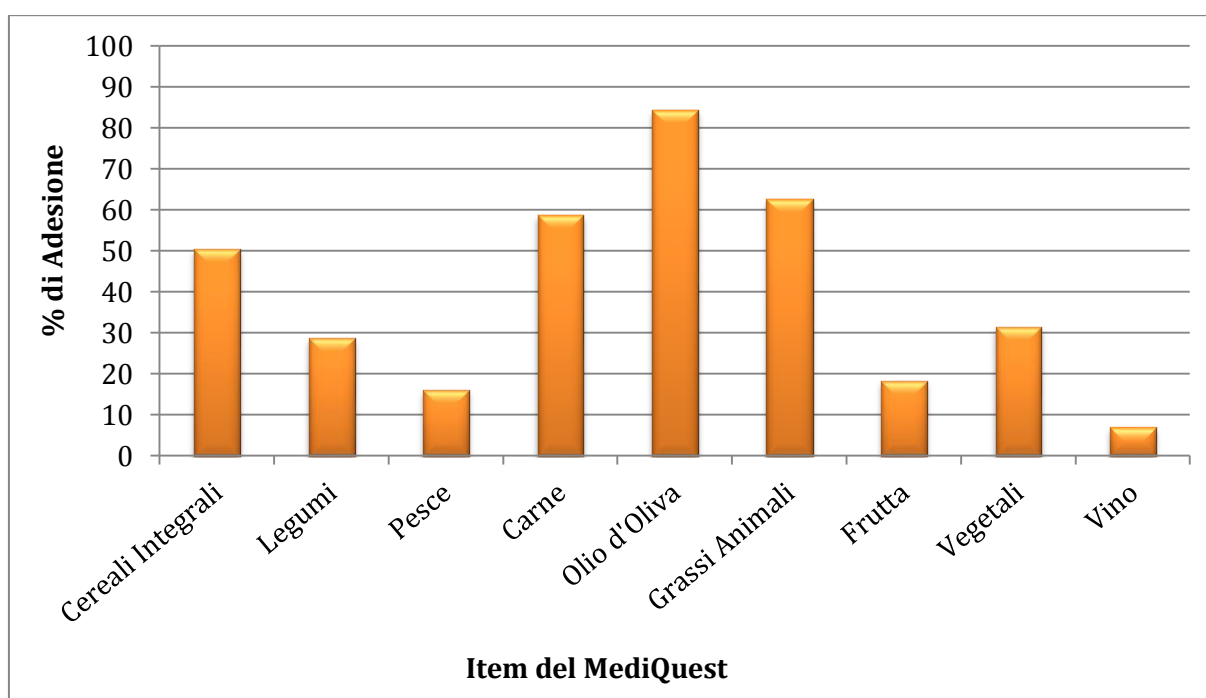
Solo il 5.1% della popolazione studiata otteneva uno score di elevata adesione al modello alimentare Mediterraneo (score 8-9); l'85.5% era equamente distribuito tra uno score discreto (score 6-7) e intermedio (score 4-5); una bassa adesione (score 0-3) era ottenuta dal 9.2% della popolazione (Tabella 2).

**Tabella 2.** Distribuzione dello score di adesione alla Dieta Mediterranea tra i partecipanti allo studio

	Popolazione Totale (n=411)		Uomini (n=181)		Donne (n=222)	
<b>Score Medio (M±DS)</b>	5.1±1.3		5.0±1.3		5.2±1.3	
	n	%	n	%	n	%
<b>Alta (Score 8-9)</b>	21	5.1	6	3.3	14	6.3
<b>Appropriata (Score 6-7)</b>	172	41.8	76	41.9	93	41.8
<b>Intermedia (Score 4-5)</b>	180	43.7	79	43.6	98	44.1
<b>Bassa (Score 0-3)</b>	38	9.2	20	11.0	17	7.6

Valutando i singoli alimenti che contribuivano allo score di adesione alla Dieta Mediterranea, si osservava una adesione elevata per il consumo di olio d'oliva (84.4%), grassi animali (65.2), carne (58.6%) e cereali integrali (50.4%); più bassa era, invece, l'adesione per il consumo di vegetali (31.4%), legumi (28.5%), frutta (18.2%), pesce (16.1%) e vino (6.8%) (Figura 2).

**Figura 2.** % di Adesione per ogni item del MediQuest nella popolazione di studio



La regressione logistica mostrava, infine, che diversi fattori erano associati ad un miglioramento dell'adesione al modello alimentare Mediterraneo; tra essi, una maggiore età, un posto di lavoro migliore, un reddito più elevato, una maggiore attenzione all'alimentazione e allo stile di vita (Tabella 3).

**Tabella 3.** Fattori associati ad una migliore adesione al modello alimentare Mediterraneo

	<b>β</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P value</b>
<b>Età (anni)</b>	.030	1.030 (1.016-1.044)	0.000
<b>Sesso</b>	-.116	0.890 (0.601-1.320)	0.563
<b>Abitudine al Fumo</b>	-.038	0.963 (0.702-1.320)	0.814
<b>IMC</b>	-.034	0.967 (0.922-1.013)	0.157
<b>Scolarità</b>	.184	1.202 (0.938-1.542)	0.146
<b>Attività Lavorativa</b>	.127	1.136 (1.043-1.237)	0.003
<b>Reddito</b>	.655	1.925 (1.467-2.526)	0.000
<b>Familiarità</b>	-.005	0.996 (0.821-1.206)	0.963
<b>Stato Civile</b>	.169	1.184 (0.975-1.437)	0.089
<b>Pasti (n/giorno)</b>	.110	1.117 (0.845-1.476)	0.438
<b>Etichette nutrizionali</b>	.721	2.057 (1.373-3.082)	0.000
<b>Importanza alimenti</b>	-.491	0.612 (0.477-0.785)	0.000
<b>Attività fisica</b>	.475	1.608 (1.075-2.406)	0.021

**Discussione e Conclusioni:** Il primo risultato importante di questa linea di ricerca è che il MediQuest rappresenta un valido strumento per determinare in modo rapido lo score di adesione alla Dieta Mediterranea, come mostrato dal valore della correlazione e dalla percentuale di soggetti che ricevono lo stesso score per ogni singolo alimento.

Tale strumento differisce dagli altri questionari presenti in letteratura sia per il numero di domande da cui è costituito, sia perché prende in considerazione solo la frequenza di consumo degli alimenti tipici della Dieta Mediterranea.

Anche Schroder et al.<sup>154-155</sup> nello studio PREDIMED hanno sviluppato un questionario breve composto da 14 domande per valutare in modo rapido l'adesione alla Dieta Mediterranea (MEDAS). Tuttavia, rispetto al nostro MediQuest, il MEDAS è poco riproducibile in popolazioni che hanno un background gastronomico diverso da quello della Spagna per diversi motivi: 1- enfatizza molto il consumo di olio d'oliva (con 2 domande sul suo consumo); 2- include alimenti che non rientrano nelle tradizioni della Dieta Mediterranea (come bevande zuccherate e dolci); 3- comprende domande su alimenti tipici delle tradizioni gastronomiche spagnole (come il soffritto).

Il punto di forza del MediQuest è che lo score di adesione alla Dieta Mediterranea è ottenuto al momento stesso della compilazione del questionario richiedendo poca collaborazione da parte dei soggetti che effettuano tale valutazione. Inoltre, poiché il MediQuest contiene domande inerenti il consumo dei soli alimenti caratteristici del modello alimentare Mediterraneo, esso può essere utilizzato per comparare lo score di adesione alla Dieta Mediterranea di popolazioni che vivono in diversi paesi del mondo.

Un altro risultato importante di questa linea di ricerca è che, tramite il MediQuest, è stato possibile ottenere in modo rapido lo score di adesione al modello alimentare Mediterraneo in un campione della popolazione Campana. I risultati di tale valutazione hanno mostrato che lo score di adesione alla Dieta Mediterranea è in linea con quelli ottenuti in altri studi che hanno effettuato lo stesso tipo di valutazione<sup>146-147</sup>.

Dallo score ottenuto nel nostro studio e dalla valutazione della letteratura degli ultimi anni, si evince che le popolazioni del Mediterraneo si stanno allontanando sempre più da tale modello alimentare, ritenuto da anni il modello da seguire e a cui avvicinare anche coloro che vivono in altri paesi per la capacità di ridurre la mortalità e le malattie croniche non trasmissibili. Basta, infatti, confrontare gli scores di adesione alla dieta Mediterranea ottenuti negli ultimi anni in studi condotti su varie popolazioni del Mediterraneo con quelli di almeno 10 anni fa, per rendersi conto dell'allontanamento sempre maggiore da tale modello alimentare. Un esempio è dato dallo studio di Bonaccio M. et al<sup>145</sup>, condotto su popolazioni dell'Italia Meridionale, in cui si è osservato come la percentuale di adesione al modello alimentare Mediterraneo si riduce notevolmente con il trascorrere degli anni; si passa, infatti, dal 31.3% del 2005-2006 al 18.3% del 2007-2010.

Importante è anche tenere presente quali sono gli alimenti che maggiormente influiscono sullo score finale di adesione alla dieta Mediterranea. E' emerso che la popolazione analizzata riesce facilmente a seguire le indicazioni della dieta Mediterranea per quel che concerne il consumo di olio d'oliva, come principale grasso da condimento e di cereali integrali; risulta avere qualche difficoltà in più per il consumo di ortaggi e legumi; ancora più difficile è aderire alle raccomandazioni per il consumo di frutta e pesce, necessario per ottenere uno score alto di adesione al modello alimentare Mediterraneo.

Un ulteriore risultato importante riguarda i fattori che maggiormente incidono sull'adesione a tale modello. Per quanto riguarda l'età, analogamente a quanto riportato in letteratura<sup>146-147, 149-151</sup>, c'è un'associazione diretta con l'adesione alla dieta Mediterranea; in particolare, al crescere dell'età aumenta l'adesione al modello alimentare Mediterraneo. Anche l'attività lavorativa svolta sembra influenzare

l'adesione al modello Mediterraneo; infatti, il nostro studio ha messo in evidenza come gli impiegati, che rappresentano la gran parte del nostro campione, ed i pensionati presentano una maggiore adesione alla dieta Mediterranea rispetto ai professionisti e agli studenti. Ciò è dovuto principalmente al fatto che chi svolge una attività lavorativa con la possibilità di consumare i pasti a casa ha meno probabilità di consumare prodotti da fast-food, ricchi in grassi e molto lontani dal modello alimentare Mediterraneo.

Importante è anche considerare che un buon predittore di adesione alla dieta Mediterranea è il reddito. Infatti, il nostro studio, in accordo con la letteratura<sup>144-148</sup>, ha confermato tale associazione, dovuta al fatto che gli alimenti della nostra tradizione sono costosi, pertanto, le famiglie meno abbienti, al fine di risparmiare, si discostano dal modello Mediterraneo, preferendo alimenti meno salutari, ma più economici.

Inoltre, dai nostri dati emerge che i soggetti che pongono maggiore attenzione sia all'alimentazione che al proprio stile di vita, hanno uno score di adesione alla dieta Mediterranea più alto. Infatti, raggiungono uno score di adesione più elevato coloro che non hanno l'abitudine al fumo, leggono le etichette nutrizionali degli alimenti e svolgono uno stile di vita più attivo. Tali dati sono perfettamente in linea con quanto emerso da diversi lavori che hanno fatto lo stesso tipo di valutazioni<sup>146-151</sup>.

In conclusione, i risultati di questa linea di ricerca mostrano che il MediQuest è un valido strumento per la valutazione dell'adesione al modello alimentare Mediterraneo. Tale adesione non è, però, molto soddisfacente; ciò sorprende e preoccupa se si tiene conto che tale valutazione è stata effettuata su un campione di soggetti che vivono in una regione considerata parte dell'area Mediterranea.



Sull'adesione è chiaro che agiscono diversi fattori, sia inerenti lo stile di vita che le conoscenze nutrizionali che la popolazione ha relativamente agli alimenti e al modello alimentare Mediterraneo. Tuttavia, anche il consumo di alimenti assume la sua importanza. Pertanto, potrebbe essere importante diffondere nella popolazione generale le conoscenze sugli alimenti caratteristici di tale modello alimentare, ponendo maggiore attenzione a quegli alimenti il cui consumo risulta particolarmente basso nel campione studiato.

## **8. Sviluppo di prototipi di alimenti funzionali arricchiti in composti bioattivi di origine vegetale: Progetto PRIN**

I risultati delle diverse linee di ricerca su riportate confermano le sempre più numerose evidenze sugli effetti benefici del consumo di composti bioattivi di origine vegetale per la riduzione del rischio di sviluppo di malattie cronico-degenerative.

Pertanto, risulta importante aumentare il consumo di composti bioattivi di origine vegetale tramite la nostra alimentazione. A tale scopo è nato il Progetto PRIN i cui obiettivi sono:

- 1) la realizzazione di prototipi di alimenti e bevande funzionali arricchiti in polifenoli della buccia d'uva con buone caratteristiche organolettiche e buona palatabilità;
- 2) la valutazione della biodisponibilità dei polifenoli in relazione alla struttura dell'alimento/bevanda prototipo, per selezionare quello(i) con le caratteristiche migliori;
- 3) testare in studi in acuto e di intervento sull'uomo l'effetto del consumo di questi alimenti/bevande funzionali arricchiti in polifenoli sul metabolismo glico-lipidico a digiuno e in fase postprandiale, sulla funzione endoteliale, infiammazione e stress ossidativo in pazienti con diabete tipo 2.

Per realizzare prototipi di alimenti ricchi in polifenoli, è fondamentale selezionare matrici alimentari ad elevato contenuto in polifenoli e con caratteristiche fisico-chimiche ed organolettiche che permettono di trasformare le stesse in prodotti fruibili per il consumatore.

Sulla base di tali considerazioni, dopo un attenta valutazione dei database disponibili sul contenuto di composti bioattivi di origine vegetale, sono state selezionate le

seguenti ma matrici alimentari: uva, caffè, tè verde, cioccolato fondente, olive, rucola, carciofi e carote nere.

A partire da queste matrici, sono stati creati snack dolci, quali Dolcetti al Caffè e Cioccolato Fondente (Tabella 1) e Dolcetti al Tè Verde (Tabella 2), il cui contenuto in polifenoli è di 259 e 725 mg/100 g GAE, rispettivamente, e snack sostituti di un pasto, quali Fagottino con rucola e formaggio light (Tabella 3) e Focaccina con rucola liofilizzata (Tabella 4), il cui contenuto in polifenoli è di 159 e 361 mg/100 g GAE, rispettivamente.

**Tabella 1.** Dolce al Caffè e Cioccolato Fondente

<b><u>Ingredienti:</u> Farina 10g, Zucchero 8g, Uova 5g, Olio di arachidi 4g, Latte 3g, Caffè in polvere 5g, Cioccolato fondente 3g</b>	
<b>Energia (Kcal)</b>	107
<b>Proteine g</b>	2
<b>Lipidi g</b>	5
<b>Saturi g</b>	1
<b>Colesterolo mg</b>	19
<b>Carboidrati g</b>	15
<b>Fibra g</b>	0.4
<b>Polifenoli mg</b>	259

**Tabella 2.** Dolce al Tè Verde e/o Marmellata d'Uva

<b><u>Ingredienti:</u> Farina 10g, Zucchero 8g, Uova 5g, Olio di arachidi 4g, Latte 3g, Tè verde 4g, Marmellata 2g</b>	
<b>Energia (Kcal)</b>	107
<b>Proteine g</b>	2
<b>Lipidi g</b>	5
<b>Saturi g</b>	1
<b>Colesterolo mg</b>	19
<b>Carboidrati g</b>	15
<b>Fibra g</b>	0.4
<b>Polifenoli mg</b>	725

**Tabella 3.** Snack salato con Rucola e Formaggio Light

<b><u>Ingredienti:</u> Pasta sfoglia 10g, Olio extravergine di oliva 20g, Rucola 200g, Formaggio light 36g</b>	
<b>Energia (Kcal)</b>	299
<b>Proteine g</b>	11
<b>Lipidi g</b>	24
<b>Saturi g</b>	3
<b>Colesterolo mg</b>	20
<b>Carboidrati g</b>	9
<b>Fibra g</b>	2
<b>Polifenoli mg</b>	159

**Tabella 4.** Focaccia alla Rucola

<b><u>Ingredienti:</u> Farina 83g, Olio di arachidi 10g, Rucola 5g, Zucchero 2g</b>	
<b>Energia (Kcal)</b>	486
<b>Proteine g</b>	22
<b>Lipidi g</b>	14
<b>Saturi g</b>	3
<b>Colesterolo mg</b>	0
<b>Carboidrati g</b>	72
<b>Fibra g</b>	22
<b>Polifenoli mg</b>	361

Sono stati, inoltre, realizzati snack e bevande a base d'uva dopo una attenta analisi del contenuto in polifenoli di uva rossa di varie cultivar, a diversi tempi di maturazione. Tale valutazione, fatta in collaborazione con un tutor dell'Azienda Vinicola "I Feudi" di Avellino, ha consentito di chiarire che le concentrazioni di polifenoli, espresse come equivalenti di acido gallico (GAE), possono variare in maniera importante a seconda della cultivar. Infatti, tra le varie cultivar analizzate, l'Aglianico dei Feudi di Avellino è risultato essere il più ricco in polifenoli e per tale motivo la sperimentazione è stata condotta su questa cultivar.

In primo luogo, è stata misurata la concentrazione di polifenoli sia negli acini che nelle bucce d'uva. E' emerso che le bucce ne sono più ricche, con una concentrazione di polifenoli che va da 400 a 800 mg/100g di prodotto, rispetto ai 200 a 300 mg di polifenoli/100g presenti negli acini tal quali. Successivamente, si è proceduto alla valutazione del contenuto in polifenoli in una bevanda a base d'uva rossa ottenuta per premitura dell'uva. E' emerso che tale bevanda ha un contenuto di polifenoli piuttosto basso, di circa 1,18 mg/100ml ed una quantità di zuccheri solubili di circa 15 g/100 ml, tale da rendere il prodotto non adatto ad essere utilizzato come fonte di polifenoli. L'attenzione è stata spostata poi sul mosto e sul vino. Il contenuto di polifenoli del mosto è risultato di 162 mg/100ml; per il vino, invece, è risultato 404 mg/100ml. Tuttavia, il vino, per il suo contenuto in alcool, non può essere utilizzato per un consumo quotidiano.

Abitualmente l'estrazione dei polifenoli dall'uva utilizza solventi organici (etanolo, metanolo, acido formico o acetone) e acqua in proporzioni differenti. Questo tipo di estrazione può comportare notevoli rischi per la salute, oltre ad essere dannoso per l'ambiente; tuttavia più recentemente si sono sviluppati metodi di estrazione tra cui estrazione a microonde, estrazione con fluidi supercritici, estrazione eco-assistita che hanno ridotto l'utilizzo di solventi organici.

Pertanto, nel presente progetto, per lo sviluppo del prototipo di bevanda a base d'uva rossa ricca di polifenoli, l'uva è stata sottoposta ad un processo di estrazione impiegando come strumento il Naviglio Estrattore® (serie LAB, mod. EXNA0101 - 500cc) che presenta una tecnologia innovativa di estrazione solido-liquido. Tale tecnica non necessita dell'ausilio di alcun solvente organico e non sottopone la matrice principale a processi di riscaldamento, raffreddamento o altro che potrebbero causare la perdita delle sostanze di interesse. Il Naviglio Estrattore,

infatti, sfrutta la pressione (circa 8-10 bar) al fine di estrarre, in maniera rapida e semplificata, nel mezzo liquido, le sostanze non chimicamente legate alla matrice solida, inoltre il processo avviene a temperatura ambiente.

Sono state effettuate diverse prove di estrazione a partire sia dagli acini tal quali che dagli acini privati della polpa (i.e. bucce e semi) per differenti tempi e in differenti condizioni, utilizzando come solvente esclusivamente acqua deionizzata a temperatura ambiente.

Le estrazioni si sono protratte fino a 72 ore per verificare la cinetica di estrazione dei polifenoli nel tempo ed ottimizzare la procedura di produzione dell'estratto d'uva.

La quantità di polifenoli totali è stata analizzata spettrofotometricamente in accordo con il metodo ufficiale AOAC che si basa sul metodo di Folin-Ciocalteu e impiego del relativo reattivo; l'acido gallico è stato impiegato come standard di riferimento e i risultati sono stati espressi in mg di acido gallico equivalenti per L di estratto (GAE \* L<sup>-1</sup>).

La curva di calibrazione è stata costruita utilizzando come standard acido gallico a concentrazioni note e crescenti, misurate a 700 nm.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'estrazione effettuata con acqua deionizzata sugli acini privati della polpa, i.e. solo su bucce e semi, è la più efficace in termini di quantità di polifenoli estratti per un tempo massimo di 48 ore; infatti, dopo tale tempo la ulteriore quantità di polifenoli estratta è irrilevante.

Il succo così ottenuto deve successivamente essere sottoposto ad un processo di pastorizzazione al fine di renderlo stabile e adatto al consumo umano.

Sul mercato è stato rinvenuto e analizzato un succo di uva di recente produzione denominato Unico prodotto da Lurisia (Acque Minerali S.r.l. Via delle Terme, 62 Fraz. Lurisia Terme - Roccaforte M.vì – CN); il contenuto di polifenoli è risultato essere pari

a 446,6 mg/L, valore che risulta in linea con il contenuto di polifenoli dell'estratto che è stato messo a punto.

Parallelamente, è stata anche sviluppata una marmellata a base d'uva rossa sempre della varietà Aglianico dei Feudi di Avellino, con un contenuto di polifenoli di 199,4 mg/100g di prodotto con circa il 41% di zuccheri solubili ed un valore calorico di circa 260 Kcal.

Nell'ambito del progetto di cui sopra, mi dedicherò successivamente alla valutazione, in acuto e in cronico, dell'effetto del consumo di questi alimenti/bevande funzionali ricchi in polifenoli sul metabolismo glico-lipidico, sulla funzione endoteliale, infiammazione e stress ossidativo in pazienti con diabete tipo 2 e in soggetti sani. Inoltre, mi occuperò del reclutamento dei pazienti, dell'intervento nutrizionale, della raccolta e conservazione dei campioni biologici e dei dosaggi di laboratorio (misurazione di lipidi, glicemia, insulina...e stress ossidativo).

## 9. Bibliografia

1. J. Salas-Salvadó, M. Á. Martínez-González, M. Bulló and E. Ros. *"The Role of Diet in the Prevention of Type 2 Diabetes"*. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2011; 21 (2): B32-B48.
2. A. Kozłowska, D. Szostak-Węgierek. *"Flavonoids Food Sources and Health Benefits"*. Roczn. Państw. Zakł. Hig., 2014; 65 (2): 79-85.
3. M. G. Priebe, J. J. van Binsbergen, R. de Vos and R. J. Vonk. *"Whole Grain Foods for the Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus"*. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, 2008.
4. K. A. Harris and P. M. Kris-Etherton. *"Effects of Whole Grains on Coronary Heart Disease Risk"*. Current Atherosclerosis Reports, 2010; 12 (6): 368-376.
5. P. Carter, L. J. Gray, J. Troughton, K. Khunti and M. J. Davies. *"Fruit and Vegetable Intake and Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus: Systematic Review and Meta-Analysis"*. BMJ, 2010; 341: c4229-c4236.
6. A. K. Thompson, A. M. Minihane and C. M. Williams. *"Trans Fatty Acids, Insulin Resistance and Diabetes"*. European Journal of Clinical Nutrition, 2011; 65 (5): 553-564.
7. S. M. Hofmann and M. H. Tschöp. *"Dietary Sugars: A Fat Difference"*. Journal of Clinical Investigation, 2009; 119 (5): 1089-1092.
8. F. Sofi, C. Macchi, R. Abbate, G.F. Gensini, A. Casini. *"Mediterranean diet and health"*. Biofactors, 2013; 39 (4): 335-342.
9. F. Sofi, F. Cesari, R. Abbate et al. *"Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis"*. BMJ, 2008; 337: a1344
10. M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, et al. *"Polyphenols, dietary sources and bioavailability."* Ann Ist Super Sanità, 2007; 43 (4): 348-61.



11. D. Ghosh and A. Scheepens. *"Vascular action of polyphenols"*. Mol Nutr Food Res, 2009; 53: 322-331.
12. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jime'nez. *"Polyphenols: food sources and bioavailability"*. Am J Clin Nutr, 2004; 79: 727-747.
13. P.A. Kroon, A. Iyer, P. Chunduri, et al. *"The cardiovascular nutraceutical pharmacology of resveratrol: pharmacokinetics, molecular mechanisms and therapeutic potential"*. Curr Med Chem, 2010; 17 (23): 2442-55.
14. A. Shih, S. Zhang, H.J. Cao. *"Inhibitory effect of epidermal growth factor on resveratrol-induced apoptosis in prostate cancer cells is mediated by protein kinase C- $\alpha$ "*. Mol Cancer Ther, 2004; 3 (11): 1355-64.
15. H.Y. Lin, A. Shih, F.B. Davis, et al. *"Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line"*. J Urol, 2002; 168 (2): 748-55.
16. J.A. Baur, K.J. Pearson, N.L. Price, et al. *"Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet"*. Nature, 2006; 444 (7117): 337-42.
17. D. Delmas, H.Y. Lin. *"Role of membrane dynamics processes and exogenous molecules in cellular resveratrol uptake: consequences in bioavailability and activities"*. Mol Nutr Food Res, 2011; 55 (8): 1142-53.
18. I. Rahman, S.K. Biswas, P.A. Kirkham. *"Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols"*. Biochem Pharmacol, 2006; 72 (11): 1439-52.
19. T. Kinoshita, Z. Lepp, H. Chuman. *"Construction of a novel database for flavonoids"*. J Med Invest, 2005; 52 Suppl: 291-2.
20. J.H. Cummings and A.M. Stephen. *"Carbohydrate terminology and classification"*. Eur J Clin Nutr, 2007; 61 Suppl 1: S5-18.

21. B.O. Schneeman. *"Dietary fibre and gastrointestinal function"*. Advanced Dietary Fibre Technology, 2001; 168-176 (Oxford: Blackwell Science Limited).
22. L. Brown et al. *"Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis"*. Am J Clin Nutr, 1999; 69 (1): 30-42.
23. V. Neveu, J. Perez-Jimenez, F. Vos, V. Crespy, C.L. Du, L. Mennen, C. Knox, R. Eisner, J. Cruz, D. Wishart & A. Scalbert. *"Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods"*. 2010.
24. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service. *"USDA database for the Isoflavone Content of Selected Foods, Release 2.0"*. Nutrient Data Laboratory, 2008.
25. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service. *"USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 2.1"*. Nutrient data Laboratory, 2007.
26. P. Brat, S. George, A. Bellamy, C.L. Du, A. Scalbert, L. Mennen, N. Arnault, & M.J. Amiot. *"Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables"*. J Nutr, 2006; 136: 2368-2373.
27. M.L. Ovaskainen, R. Torronen, J.M. Koponen, H. Sinkko, J. Hellstrom, H. Reinivuo & P. Mattila. *"Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults"*. J Nutr, 2008; 138: 562-566.
28. C. Leclercq, D. Arcella, R. Piccinelli, S. Sette, C. Le Donne, A. Turrini, INRAN-SCAI 2005-06 Study Group. *"The Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI 2005-06: main results in terms of food consumption"*. Public Health Nutr, 2009; 12: 2504-32.
29. A. Raffo, C. Leonardi, V. Fogliano, P. Ambrosino, M. Salucci, L. Gennaro, et al. *"Nutritional value of cherry tomatoes harvested at different ripening stages"*. J Agric Food Chem, 2002; 50: 6550-6.

30. S. De Pascale, A. Maggio, R. Pernice, V. Fogliano, G. Barbieri. *"Sulphur fertilization may improve the nutritional value of Brassica rapa L. subsp. Sylvestris"*. Eur J Agron, 2007; 26: 418-24.
31. R. Ferracane, N. Pellegrini, A. Visconti, G. Graziani, et al. *"Effects of different cooking methods on antioxidant profile, antioxidant capacity, and physical characteristics of artichoke"*. J Agric Food Chem, 2008; 56: 8601-8.
32. C. Miglio, E. Chiavaro, A. Visconti, V. Fogliano, N. Pellegrini. *"Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables"*. J Agric Food Chem, 2008; 56: 139-47.
33. N. Pellegrini, E. Chiavaro, C. Gardana, T. Mazzeo, D. Contino, et al. *"Effect of different cooking methods on color, phytochemical concentration, and antioxidant capacity of raw and frozen brassica vegetables"*. J Agric Food Chem, 2010; 58: 4310-21.
34. O.K. Chun, S.J. Chung, W.O. Song. *"Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults"*. J Nutr, 2007; 137: 1244-1252.
35. S. Gonzalez, M. Fernandez, A. Cuervo & C. Lasheras. *"Dietary intake of polyphenols and major food sources in an institutionalised elderly population"*. J Hum Nutr Diet, 2014; 27: 176-183.
36. S. Sette et al. *"The third Italian National Food Consumption Survey, INRAN-SCAI 2005-06 - Part 1: Nutrient intakes in Italy"*. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2010.
37. I.C. Arts & P.C. Hollman. *"Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies"*. Am J Clin Nutr, 2005; 81: 317S-325S.
38. G. Williamson & C. Manach. *"Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies"*. Am J Clin Nutr, 2005; 81: 243S-255S.

39. R.L. Prior & X. Wu. *"Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities"*. Free Radic Res, 2006; 40: 1014-1028.
40. J.W. Erdman, D. Balentine, L. Arab, G. Beecher, J.T. Dwyer, et al. *"Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop"*. J Nutr, 2007; 137: 718S-737S.
41. L. Wang, I.M. Lee, S.M. Zhang, J.B. Blumberg, J.E. Buring, et al. *"Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women"*. Am J Clin Nutr, 2009; 89: 905-912.
42. H. Sies. *"Polyphenols and health: update and perspectives"*. Arch Biochem Biophys, 2010; 501: 2-5.
43. R. Andriantsitohaina, C. Auger, T. Chataigneau, N. Etienne-Selloum, H. Li, M.C. Martinez, V.B. Schini-Kerth, I. Laher. *"Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols"*. Br J Nutr, 2012; 108: 1-18.
44. I. Erlund, R. Koli, G. Alfthan, J. Marniemi, P. Puukka, P. Mustonen, P. Mattila, A. Jula. *"Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol"*. Am J Clin Nutr, 2008; 87: 323-331.
45. A. Medina-Remón, R. Estruch, A. Tresserra-Rimbau, A. Vallverdu-Queralt, R.M. Lamuela-Raventos. *"The effect of polyphenol consumption on blood pressure"*. Mini Rev Med Chem, 2013; 13: 1137-1149.
46. C. Bladé, L. Arola, M.J. Salvadó. *"Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms"*. Mol Nutr Food Res, 2010; 54 (1): 37-59.
47. T. Nagao, Y. Komine, S. Soga, et al. *"Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men"*. Am J Clin Nutr, 2005; 81 (1): 122-9.

48. S. Sae-tan, K.A. Grove, J.D. Lambert. *"Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea"*. Pharmacol Res, 2011; 64 (2): 146-54.
49. A. Di Castelnuovo, R. di Giuseppe, L. Iacoviello, et al. *"Consumption of cocoa, tea and coffee and risk of cardiovascular disease"*. Eur J Intern Med, 2012; 23 (1): 15-25.
50. M. Das, D.K. Das. *"Resveratrol and cardiovascular health."* Mol Aspects Med, 2010; 31 (6): 503-12.
51. A. Borriello, V. Cucciolla, F. Della Ragione, et al. *"Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis"*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010; 20 (8): 618-25.
52. NCEP expert panel. *"Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) (Adult treatment panel III)"*. JAMA, 2001; 285: 2486-97.
53. L. Brown, B. Rosner, W.W. Willett, et al. *"Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis"*. Am J Clin Nutr, 1999; 69: 30-42.
54. S. Kelly, C. Summerbell, A. Brynes, et al. *"Wholegrain cereal for coronary heart disease"*. Cochrane Database Syst Rev, 2007; 18.
55. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *"Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta-glucans and maintenance of normal blood cholesterol concentrations and maintenance or achievement of a normal body weight pursuant to Article 13 of Regulation No 1924/2006 on request from the European Commission"*. EFSA Journal, 2009; 7 (9): 1254.
56. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *"Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to guar gum and maintenance of normal blood glucose concentrations, increase in satiety and maintenance of normal blood"*

*cholesterol concentrations pursuant to Article 13 of Regulation No 1924/2006*". EFSA Journal, 2010; 8 (2): 1464.

**57.** Tosh SM. *"Review of human studies investigating the post-prandial blood-glucose lowering ability of oat and barley food products"*. Eur J Clin Nutr, 2013; 67: 310-317.

**58.** De Natale C, Annuzzi G, Bozzetto L, Mazzarella R, Costabile G, Ciano O et al. *"Effects of a plant-based high-carbohydrate/high-fiber diet versus high-monounsaturated fat/low-carbohydrate diet on postprandial lipids in type 2 diabetic patients"*. Diabetes Care, 2009; 32: 2168-2173.

**59.** Riccardi G, Rivellese AA, Giacco R. *"Role of glycemic index and glycemic load in the healthy state, in prediabetes, and in diabetes"*. Am J Clin Nutr, 2008; 87: S269-S274.

**60.** Giacco R, Lappi J, Costabile G, Kolehmainen M, Schwab U, Landberg R et al. *"Effects of rye and whole wheat versus refined cereal foods on metabolic risk factors: a randomised controlled two-centre intervention study"*. Clin Nutr, 2013; 32: 941-949.

**61.** Higgins JA. *"Whole grains, legumes, and the subsequent meal effect: implications for blood glucose control and the role of fermentation"*. J Nutr Metab, 2012.

**62.** Ancel B. Keys. *"Seven Countries: A Multivariate Analysis of Death and Coronary Heart Disease"*. Cambridge (Massachusetts), Harvard University Press, 1980, ISBN 0-674-80237-3.

**63.** A. Fidanza, et al. *"La dieta mediterranea"*. Borgia E. Roma, 1984.

**64.** F. Sofi, R. Abbate, G.F. Gensini, A. Casini. *"Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis"*. Am J Clin Nutr, 2010; 92: 1189-96.

**65.** M.I. Covas. *"Olive oil and cardiovascular system"*. Pharmacol Res, 2007; 55: 175-186.

66. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadò J, et al. *"Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet"*. N Engl J Med, 2013; 1-12.
67. Ros E, Martinez-Gonzalez MA, Estruch R, et al. *"Mediterranean diet and cardiovascular health: teachings of the PREDIMED Study"*. Adv Nutr, 2014; 5 (3), 330S-336S.
68. Schwingshackl L & Hoffmann G. *"Mediterranean dietary pattern, inflammation and endothelial function: a systematic review and meta-analysis of intervention trials"*. NMCD, 2014; 1-11.
69. Georgoulis M, Kontogianni MD, Yiannakouris N. *"Mediterranean diet and diabetes: prevention and treatment"*. Nutrients, 2014; 6 (4), 1406-1423.
70. Grosso G, Mistretta A, Marventano S, et al. *"Beneficial effects of the Mediterranean diet on metabolic Syndrome"*. Curr Pharm Des, 2014; 20, 1-6.
71. Panico S, Mattiello A, Panico C, et al. *"Mediterranean dietary pattern and chronic diseases"*. Cancer Treat Res, 2014; 159, 69-81.
72. Sofi F, Macchi C, Abbate R, et al. *"Mediterranean diet and health"*. Biofactors, 2013; 39 (4), 335-342.
73. Grosso G, Pajak A, Mistretta A, et al. *"Protective role of the Mediterranean diet on several cardiovascular risk factors: evidence from Sicily, southern Italy"*. NMCD, 2013; 1-8.
74. Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T, et al. *"Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study"*. BMJ, 2005; 1-7.
75. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, et al. *"Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population"*. N Engl J Med, 2003; 348, 2599-2608.
76. Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, et al. *"Diet and overall survival in elderly people"*. BMJ, 1995; 311, 1457-1460.

77. Osler M & Schroll M. *"Diet and mortality in a cohort of elderly people in a north European community"*. Int J Epidemiol, 1997; 26, 155-159.
78. Lasheras C, Fernandez S, Patterson AM. *"Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people"*. Am J Clin Nutr, 2000; 71 (4), 987-992.
79. Knuops KT, de Groot LC, Kromhout D, et al. *"Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project"*. JAMA, 2004; 292, 1433-1439.
80. Hoevenaer-Blom MP, Nooyens ACJ, Kromhout D, et al. *"Mediterranean style diet and 12-year incidence of cardiovascular disease: the EPIC-NL cohort study"*. Plos One, 2012; 7 (9), 1-7.
81. Menotti A, Puddu PE, Lanti M, et al. *"Lifestyle habits and mortality from all and specific causes of death: 40-year follow-up in the Italian rural areas of the seven countries study"*. J Nutr Health Aging, 2014; 18 (3), 314-321.
82. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anad S. *"Global burden of cardiovascular disease Part II: variation in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies"*. Circulation, 2001; 104 (23): 2855-2864.
83. Stephens JW, Carman JE, Prior SL, Jones DA, Price DE. *"Glycaemic control and other cardiovascular risk factors should be targeted independently in patients with type 2 diabetes mellitus"*. Atherosclerosis, 2011; 217 (1): 297-298.
84. Rivellese AA. *"Diet and cardiovascular disease: beyond cholesterol"*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2005; 6: 395-398.
85. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. *"Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women"*. JAMA, 2007; 298: 299-308.



- 86.** Blaak EE, Antoine JM, Benton D, Björck I, Bozzetto L, Brouns F, Diamant M, Dye L, Hulshof T, Holst JJ, Lamport DJ, Laville M, Lawton CL, Meheust A, Nilson A, Normand S, Rivellese AA, Theis S, Torekov SS, Vinoy S. *“Impact of postprandial glycaemia on health and prevention of disease”*. Obes Rev, 2012; 13: 923-984.
- 87.** Marckmann P, Grønbaek M. *“Fish consumption and coronary heart disease mortality. A systematic review of prospective cohort studies”*. Eur J Clin, 1999; 53 (8): 58-590.
- 88.** Visioli F, Hagen TM. *“Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: focus on micronutrients”*. Pharmacol Res, 2007; 55 (3): 199-206.
- 89.** Xun P, He K. *“Fish Consumption and Incidence of Diabetes: meta-analysis of data from 438,000 individuals in 12 independent prospective cohorts with an average 11-year follow-up”*. Diabetes Care, 2012; 35: 930-938.
- 90.** Liu YJ, Zhan J, Liu XL, Wang Y, Ji J, He QQ. *“Dietary flavonoids intake and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies”*. Clin Nutr 2014; 33: 59-63.
- 91.** Bucher HC, Hengstler P, Schindler C, Meier G. *“n-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials”*. Am J Med, 2002; 112 (4): 298-304.
- 92.** Stoke KS, Baer DJ. *“Tea consumption may improve biomarkers of insulin sensitivity and risk factors for diabetes”*. J Nutr, 2008; 138 (8): 1584S-1588S.
- 93.** Trautwein EA, Du Y, Meyen E, Yan X, Wen Y, Wang H, Molhuizen HO. *“Purified black tea theaflavins and theaflavins/cathechin supplements did not affect serum lipids in healthy individuals with mildly to moderately elevated cholesterol concentrations”*. Eur J Nutr, 2009; 49 (1): 27-35.

- 94.** Naissides M, Mamo JC, James AP, Pal S. *"The effect of acute red wine polyphenol consumption on postprandial lipaemia in postmenopausal women"*. Atherosclerosis, 2004; 177 (2): 401-408.
- 95.** National Cholesterol Education Program (NCEP). *"Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) (2002) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report"*. Circulation 106, 3143-421.
- 96.** Tabelle di Composizione degli Alimenti - Aggiornamento 2000 INRAN - Carnovale E, Marletta L, eds. EDRA, 2000.
- 97.** Box, JD. *"Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters"*. Water Res, 1983; 17: 511-25.
- 98.** Anthropometric Standardization Reference Manual. Lohman TM, Roche AF, Martorell R, eds. Human Kinetics Pub, 1988.
- 99.** Rivellese AA, De Natale C, Di Marino L, Patti L, Iovine C, Coppola S, Del Prato S, Riccardi G, Annuzzi G. *"Exogenous and endogenous postprandial lipid abnormalities in type 2 diabetic patients with optimal blood glucose control and optimal fasting triglyceride levels"*. J Clin Endocrinol Metab, 2004; 89: 2153-2159.
- 100.** Pacini G, Mari A. *"Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and beta-cell function"*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2003; 17: 305-322.
- 101.** Stadler M, Pacini G, Petrie J, Luger A, Anderwald C; RISC Investigators. *"Beta cell (dys)function in non-diabetic offspring of diabetic patients"*. Diabetologia, 2009; 52: 2435-2444.

- 102.** Bladé C, Arola L, Salvadó MJ. *"Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms"*. Mol Nutr Food Res, 2010; 54: 37-59.
- 103.** Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, Cassidy A. *"Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials"*. Am J Clin Nutr, 2012; 95: 740-51.
- 104.** Burton-Freeman B. *"Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science"*. Br J Nutr, 2010; 104 Suppl 3: S1-14.
- 105.** Lin JK, Lin-Shiau SY. *"Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols"*. Mol Nutr Food Res, 2006; 50: 211-7.
- 106.** Spiteller G. *"Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products"*. Free Radic Biol Med, 2006; 41: 362-87.
- 107.** Qa'dan F, Verspohl EJ, Nahrstedt A, Petereit F, Matalka KZ. *"Cinchonain Ib isolated from Eriobotrya japonica induces insulin secretion in vitro and in vivo"*. J Ethnopharmacol, 2009; 124:224-227.
- 108.** Liu IM, Chen WC, Cheng JT. *"Mediation of beta-endorphin by isoferulic acid to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats"*. J Pharmacol Exp Ther, 2003; 307: 1196-1204.
- 109.** Zunino SJ, Storms DH, Stephensen CB. *"Diets rich in polyphenols and vitamin A inhibit the development of type I autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice"*. J Nutr, 2007; 137: 1216-1221.
- 110.** Scazzocchio B, Vari R, Filesi C, D'Archivio M, Santangelo C, Giovannini C. *"Cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by*

*upregulating PPAR $\gamma$  activity in human omental adipocytes*". Diabetes, 2011; 60: 2234-2244.

**111.** Rains TM, Agarwal S, Maki KC. "*Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review*". J Nutr Biochem, 2011; 22: 1-7.

**112.** Scalbert A, Williamson G. "*Dietary intake and bioavailability of polyphenols*". J Nutr, 2000; 130: 2073S-2085S.

**113.** Mann JI, De Leeuw I, Hermansen K, Karamanos B, Karlström B, Katsilambros N, et al. on behalf of the Diabetes and Nutrition Study Group (DNSG) of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). "*Evidence based nutritional approaches to the treatment and prevention of diabetes mellitus*". Nutr Metab Cardiovasc Dis 2004; 14: 373-394.

**114.** Associazione Medici Diabetologi (AMD) e Società Italiana di Diabetologia (SID). "*Standard italiani per la cura del diabete mellito 2009-2010*". Infomedica 2010.

**115.** Rivellese AA, Boemi M, Cavalot F, Costagliola L, De Feo P, Miccoli R, et al. on behalf of The Mind.it Study Group (FoRiSID). "*Dietary habits in type II diabetes mellitus : how is adherence to dietary recommendations ?*". European Journal of Clinical Nutrition 2008; 62: 660-664.

**116.** Thanopoulou A, Karamanos B, Angelico F, Assaad-Khalil S, Barbato A, Del Ben M, et al. Multi-Centre Study of the Mediterranean Group for the Study of diabetes (MGSD). "*Nutritional habits of subjects with type 2 diabetes mellitus in the Mediterranean Basin: comparison with the non-diabetic population and the dietary recommendations*". Diabetologia 2004; 47: 367-376.

**117.** Helmer C, Bricout H, Gin H and Barberger-Gateau P. "*Macronutrient intake and discrepancy with nutritional recommendations in a group of elderly diabetic subjects*". British Journal of Nutrition 2008; 99: 632-638.

- 118.** Vitolins MZ, Anderson AM, Delahanty L, Raynor H, Miller GD, Mobley C, et al. *"Action for Health in Diabetes (LOOK AHEAD) TRIAL: baseline evaluation of selected nutrients and food group intake"*. Journal of the American Dietetic Association 2009; 109 (8): 1367-1375.
- 119.** Mannucci E, Bartali B, Molino Lova R, Papucci M, Lauretani F, Luisi ML, et al. *"Eating habits in elderly diabetic subjects: Assessment in the InCHIANTI Study."* Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 2008; 18 (4): 278-282.
- 120.** Ma Y, Olendzki BC, Hafner AR, Chiriboga DE, Culver AL, Andersen VA, et al. *"Low-carbohydrate and high-fat intake among adult patients with poorly controlled type 2 diabetes mellitus"*. Nutrition 2006; 22 (11-12): 1129-1136.
- 121.** Grylls WK, McKenzie JE, Horwath CC, Mann JI. *"Lifestyle factors associated with glycaemic control and body mass index in older adults with diabetes"* European Journal of Clinical Nutrition 2003; 57 (11): 1386-1393.
- 122.** Vaccaro O, Masulli M, Bonora E, Del Prato S, Giorda CB, Maggioni AP, et al. *"Addition of either pioglitazone or a sulfonylurea in type 2 diabetic patients inadequately controlled with metformin alone: Impact on cardiovascular events. A randomized controlled trial"*. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases 2012; xx: 1-10.
- 123.** Pisani P, Faggiano F, Krogh V, Palli D, Vineis P, Berrino F. *"Relative Validity and Reproducibility of a Food Frequency Dietary Questionnaire for Use in the Italian EPIC Centres"*. International Journal of Epidemiology 1997; 26: S152-S160.
- 124.** Salvini S, Parpinel M, Gnagnarella P, et al. *"Banca dati di composizione degli alimenti per studi epidemiologici in Italia."* IEO 1998.
- 125.** Foster-Powell K, Holt SH, Brand-Miller JC. *"International table of glycemic index and glycemic load values"*. American Journal of Clinical Nutrition 2002; 77 (4): 994.

- 126.** Sofi F, Innocenti G, Dini C, Masi L, Battistini NC, Brandi ML, et al. *"Low adherence of a clinically healthy Italian population to nutritional recommendations for primary prevention of chronic diseases"*. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases 2006; 16: 436-444.
- 127.** Centritto F, Iacoviello L, di Giuseppe R, De Curtis A, Costanzo S, Zito F, et al. *"Dietary patterns, cardiovascular risk factors and C-reactive protein in a healthy Italian population"*. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases 2009; 19: 697-706.
- 128.** Estruch R, Ros E, Salas-Salvadò J, et al. *"Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet"*. N Engl J Med. 2013; 1-12.
- 129.** Ros E, Martinez-Gonzalez MA, Estruch R, et al. *"Mediterranean diet and cardiovascular health: teachings of the PREDIMED Study"*. Adv Nutr. 2014; 5 (3), 330S-336S.
- 130.** Schwingshackl L & Hoffmann G. *"Mediterranean dietary pattern, inflammation and endothelial function: a systematic review and meta-analysis of intervention trials"*. NMCD. 2014; 1-11.
- 131.** Georgoulis M, Kontogianni MD, Yiannakouris N. *"Mediterranean diet and diabetes: prevention and treatment"*. Nutrients. 2014; 6 (4), 1406-1423.
- 132.** Grosso G, Mistretta A, Marventano S, et al. *"Beneficial effects of the Mediterranean diet on metabolic Syndrome"*. Curr Pharm Des. 2014; 20, 1-6.
- 133.** Panico S, Mattiello A, Panico C, et al. *"Mediterranean dietary pattern and chronic diseases"*. Cancer Treat Res. 2014; 159, 69-81.
- 134.** Sofi F, Macchi C, Abbate R, et al. *"Mediterranean diet and health"*. Biofactors. 2013; 39 (4), 335-342.

- 135.** Grosso G, Pajak A, Mistretta A, et al. *“Protective role of the Mediterranean diet on several cardiovascular risk factors: evidence from Sicily, southern Italy”*. NMCD. 2013; 1-8.
- 136.** Osler M & Schroll M. *“Diet and mortality in a cohort of elderly people in a north European community”*. Int J Epidemiol. 1997; 26, 155-159.
- 137.** Lasheras C, Fernandez S, Patterson AM. *“Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people”*. Am J Clin Nutr. 2000; 71 (4), 987-992.
- 138.** Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, et al. *“Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project”*. JAMA. 2004; 292, 1433-1439.
- 139.** Hoevenaer-Blom MP, Nooyens ACJ, Kromhout D, et al. *“Mediterranean style diet and 12-year incidence of cardiovascular disease: the EPIC-NL cohort study”*. Plos One. 2012; 7 (9), 1-7.
- 140.** Menotti A, Puddu PE, Lanti M, et al. *“Lifestyle habits and mortality from all and specific causes of death: 40-year follow-up in the Italian rural areas of the seven countries study”*. J Nutr Health Aging. 2014; 18 (3), 314-321.
- 141.** A. E. Bonanni, M. Bonaccio, A. di Castelnuovo, F. de Lucia, et al. *“Food Labels Use Is Associated with Higher Adherence to Mediterranean Diet: Results from the Moli-Sani Study”*. Nutrients, 2013; 4364-4379.
- 142.** Nasreddine L., Mokdad A., Adra N., Tabet M., Hwalla N. *“Nutrition transition and cardiovascular disease risk factors in Middle East and North Africa countries: Reviewing the evidence”*. Ann Nutr Metab, 2010; 57, 193-203.
- 143.** Popkin B.M., Adair L.S., Ng S.W. *“Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries”*. Nutr Rev, 2012; 70, 3-21.

- 144.** M. Bonaccio, A. E. Bonanni, A. Di Castelnuovo, et al. *“Low income is associated with poor adherence to a Mediterranean diet and a higher prevalence of obesity: cross-sectional results from the Moli-sani study”*. BMJ Open, 2012; 19; 2 (6).
- 145.** M. Bonaccio, A. Di Castelnuovo, A. E. Bonanni, et al. *“Decline of the Mediterranean diet at a time of economic crisis. Results from the Moli-sani study”*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2014.
- 146.** Grosso G., Marventano S., Giogianni G., Raciti T., Galvano F., Mistretta A. *“Mediterranean diet adherence rates in Sicily, southern Italy”*. Public Health Nutrition, 2013; 14: 1-9.
- 147.** León-Muñoz LM., Guallar-Castillón P., Graciani A., et al. *“Adherence to the Mediterranean diet pattern has declined in Spanish adults”*. J Nutr, 2012; 142 (10): 1843-50.
- 148.** A. Katsarou, S. Tyrovolas, T. Psaltopoulou, A. Zeimbekis, et al. *“Socio-economic status, place of residence and dietary habits among the elderly: the Mediterranean islands study”*. Public Health Nutrition, 2013; 13 (10): 1614-1621.
- 149.** M.C. Patino-Alonso, J.I. Recio-Rodríguez, J.F.M. Belio, R. Colominas-Garrido, et al. *“Factors Associated with Adherence to the Mediterranean Diet in the Adult Population”*. J Acad Nutr Diet, 2014; 114 (4): 583-9.
- 150.** Pericas-Beltran J, Martinez-Andreu S, Aguilo-Pons A. *“Clustering of lifestyle factors in Spanish university students: the relationship between smoking, alcohol consumption, physical activity and diet quality”*. Public Health Nutrition, 15 (11), 2131-2139.
- 151.** Sánchez-Villegas A, Martínez J.A, De Irala J, Martínez-González M.A. *“Determinants of the adherence to an “a priori” defined Mediterranean dietary pattern”*. Eur J Nutr, 2002; 41: 249-257.



- 152.** Baltas G. *"The effects of nutrition information on consumer choice"*. J Advert Res, 2001; 41: 57-63.
- 153.** M. Bonaccio, A. Di Castelnuovo, S. Costanzo, F. De Lucia, et al. *"Mass media information and adherence to Mediterranean diet: results from the Moli-sani study"*. Int J Public Health, 2012; 57 (3): 589-97.
- 154.** Schroder H, Fito M, Estruch R, et al. *"A short screener is valid for assessing Mediterranean diet adherence among older Spanish men and women"*. J Nutr. 2011; 141, 1140-1145.
- 155.** Martinez-Gonzalez MA, Garcia-Arellano A, Toledo E, et al. *"A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial"*. Plos One. 2012; 7 (8), 1-10.

## 10. Pubblicazioni

### *Lavori in estenso su riviste con peer review ed impact factor:*

1. L. Bozzetto, G. Annuzzi, G. Pacini, G. Costabile, C. Vetrani, **M. Vitale**, ....., G. Riccardi, A.A. Rivellese. *"Polyphenol-rich diets improve glucose metabolism in people at high cardiometabolic risk: a controlled randomized intervention trial"*. Diabetologia 2015 in press
2. G. Annuzzi, L. Bozzetto, G. Costabile, R. Giacco, A. Mingione, G. Anniballi, **M. Vitale**, ....., G. Riccardi, A.A. Rivellese. *"Diets naturally rich in poliphenols improve fasting and postprandial dyslipidemia and reduce oxidative stress: a randomized controlled trial"*. Am J Clin Nutr 2014; doi: 10.3945
3. R. Giacco, B. De Giulio, **M. Vitale**, R. Cozzolino. *"Functional Foods: Can Food Technology Help in the Prevention and Treatment of Diabetes?"* Food and Nutrition Sciences, 2013; 4: 827-837
4. **M. Vitale**, D. Luongo, D. Naviglio, L. Bozzetto, M. Mirabella, A.M. Riviuccio, A. Giacco, A.A. Rivellese. *"Trans fatty acids consumption in type 1 diabetic patients: evaluation by dietary records and measurement in serum phospholipids"*. Acta Diabetologica, 2013; 50 (4): 651-4
5. **M. Vitale**, M. Masulli, A.A. Rivellese, A.C. Babini, M. Boemi, E. Bonora, ....., G. Riccardi, O. Vaccaro on behalf of the TOSCA.IT Study Group. *"Influence of dietary fat, carbohydrates and added sugars on plasma triglycerides and HDL-Cholesterol in patients with diabetes"*. In corso di revisione
6. **M. Vitale**, R. Schiano di Cola, A. Giacco, E. Parente, G. Riccardi, R. Giacco. *"A simplified 9-item screening tool to assess adherence to the traditional Mediterranean diet"*. In corso di revisione

7. **M. Vitale**, E. Racca, R. Schiano di Cola, A. Giacco, G. Riccardi, R. Giacco. "Factors Associated with Adherence to the Mediterranean Diet in Italian Population". In corso di revisione

***Lavori in estenso su riviste con peer review senza impact factor:***

8. **M. Vitale**, M. Masulli, A. Turco, O. Ciano, G. Riccardi, A.A. Rivellese, P. Auletta, .....O. Vaccaro (a nome del Gruppo di Studio TOSCA.IT). "*Eating habits of patients with type 2 diabetes mellitus: Impact of regional gastronomic traditions. A population based study*". G It Diabetol Metab 2013; 33: 135-140
9. A.A. Turco, **M. Vitale** (a nome del Gruppo di Studio TOSCA.IT). "*Relazione tra abitudini alimentari, caratteristiche antropometriche e profilo glicometabolico in pazienti con diabete tipo 2*". Il Giornale di AMD 2013; 16: 327-332
10. R. Giacco, G. Costabile, **M. Vitale**, B. De Giulio. "*L'uso di tecnologie alimentari per la produzione di alimenti funzionali utili nella prevenzione e terapia del diabete tipo 2*". Il Giornale di AMD, 2012; 15: 75-83

***Lavori divulgativi:***

11. R. Giacco, **M. Vitale**, L. Fontana. "*La terapia medica nutrizionale nel diabete mellito: Alimenti per diabetici e nutraceutici*". Le Raccomandazioni Nutrizionali 2013-2014 (Gruppo di Studio ADI-AMD-SID Nutrizione e Diabete, 2013; 154-163

***Capitoli Libri:***

12. R. Giacco, **M. Vitale**, G. Riccardi. "*Pasta: Role in Diet*". Encyclopedia of Food and Health

### ***Abstract presentati a Congressi Internazionali:***

13. E. Griffo, G. Costabile, G. Annuzzi, L. Bozzetto, R. Giacco, P. Vitaglione, **M. Vitale**, ....., G. Riccardi, A.A. Rivellese. *"Effects of dietary n-3 fatty acid and/or polyphenols on subclinical inflammation in people at high cardiovascular risk: the ETHERPATHS project"*. Accettato per l'83rd European Atherosclerosis Society Congress 22-25 Marzo 2015 Glasgow, UK.
14. L. Bozzetto, G. Annuzzi, G. Costabile, R. Giacco, G. Della Corte, **M. Vitale**, ....., G. Riccardi, A.A. Rivellese. *"Diets rich in polyphenols and/or n-3 fatty acids reduce postprandial dyslipidemia and oxidative stress in a randomized controlled trial: the Etherpaths Project"*. ADA, Chicago, 21-25 Giugno 2013
15. G. Costabile, G. Annuzzi, L. Bozzetto, G. Della Corte, A. Giacco, **M. Vitale**, ....., G. Riccardi, A.A. Rivellese. *"Effects of dietary polyphenols and/or n-3 fatty acids on oxidative stress in people at high cardiovascular risk: the Etherpaths Project"*. EAS Lione, 2-5 Giugno 2013

### ***Abstract presentati a Congressi Nazionali:***

16. C. Vetrani, L. Bozzetto, G. Costabile, ....., **M. Vitale**, A. Tura, G. Riccardi, A.A. Rivellese. *"Una dieta naturalmente ricca in polifenoli migliora il metabolismo glucidico in soggetti ad alto rischio cardiometabolico: progetto ETHERPATHS"*. Comunicazione orale accettata per la Riunione Annuale Del Gruppo di Studio "Diabete e Aterosclerosi", 20 - 21 febbraio 2015, Bologna.
17. E. Griffo, G. Costabile, G. Annuzzi, L. Bozzetto, R. Giacco, P. Vitaglione, **M. Vitale**, ....., G. Riccardi, A.A. Rivellese. *"Effetti di diete ricche in acidi grassi n-3 e/o polifenoli sull'infiammazione subclinica in soggetti ad alto rischio cardiovascolare: Progetto ETTERPATHS"*. Comunicazione orale accettato per la

Riunione Annuale Del Gruppo di Studio "Diabete e Aterosclerosi", 20 - 21 febbraio 2015, Bologna.

18. P. Boccia, R. Schiano di Cola, **M. Vitale**. *"Conoscere le indicazioni per una sana alimentazione influenza le scelte alimentari?"*. 26° Congresso Nazionale ANDID, Padova 15-17 Maggio 2014
19. P. Boccia, R. Schiano di Cola, **M. Vitale**. *"Abitudini alimentari e adesione alle raccomandazioni nutrizionali di un campione rappresentativo della popolazione della Basilicata"*. 26° Congresso Nazionale ANDID, Padova 15-17 Maggio 2014
20. **M. Vitale**, R. Schiano di Cola, P. Boccia, A.M. Riviuccio, A. Giacco. *"Modifiche delle abitudini alimentari della popolazione italiana negli ultimi 40 anni"*. 26° Congresso Nazionale ANDID, Padova 15-17 Maggio 2014
21. **M. Vitale**, R. Schiano di Cola, P. Boccia, A.M. Riviuccio, A. Giacco. *"Influenza del background gastronomico locale sulle scelte alimentari di pazienti con diabete tipo 2"*. 26° Congresso Nazionale ANDID, Padova 15-17 Maggio 2014
22. P. Boccia, **M. Vitale**, R. Schiano di Cola, R. Giacco, E. Parente. *"Valutazione delle abitudini alimentari in un campione non selezionato di individui della Regione Basilicata: esiste una differenza di genere?"*. XXI Congresso Nazionale ADI, Milano 19-22 Novembre 2014
23. P. Boccia, **M. Vitale**, R. Schiano di Cola, A. Giacco, G. Riccardi. *"La diffusione delle conoscenze inerenti una sana e corretta alimentazione può essere uno strumento di cambiamento dello stile di vita?"*. XXI Congresso Nazionale ADI, Milano 19-22 Novembre 2014
24. R. Schiano di Cola, **M. Vitale**, P. Boccia, A. Giacco, R. Giacco, G. Riccardi. *"Modifiche delle abitudini alimentari della popolazione italiana negli ultimi 40 anni"*. XXI Congresso Nazionale ADI, Milano 19-22 Novembre 2014

- 25. M. Vitale**, R. Schiano di Cola, P. Boccia, A. Giacco, E. Racca, A. Izzo, R. Giacco, G. Riccardi. *"Mediterraneità della dieta in un campione di soggetti della popolazione campana"*. XXI Congresso Nazionale ADI, Milano 19-22 Novembre 2014
- 26. M. Vitale**, R. Schiano di Cola, E. Cannarsa, ....., A.A. Rivellese, G. Riccardi, O. Vaccaro, a nome del Gruppo di Studio TOSCA.IT – Società Italiana di Diabetologia. *"Le scelte alimentari dei pazienti con diabete tipo 2: influenza del background gastronomico locale"*. XXI Congresso Nazionale ADI, Milano 19-22 Novembre 2014
- 27. M. Vitale**, O. Ciano, E. Cannarsa, ..... a nome del Gruppo di Studio TOSCA.IT – Società Italiana di Diabetologia. *"Associazione tra il consumo di carboidrati ed il profilo lipidico in pazienti con diabete tipo 2"*. 25° Congresso Nazionale SID, Bologna 28-31 Maggio 2014; VII Giornate Diabetologiche Sorrentine, Sorrento 16-18 Ottobre 2014
- 28.** G. Della Pepa, G. Annuzzi, G. Costabile, L. Bozzetto, S. Cocozza, G. Della Corte, A. Giacco, **M. Vitale**, ....., G. Riccardi, A.A. Rivellese. *"Effetti di diete ricche in polifenoli e/o acidi grassi n-3 sullo stress ossidativo in soggetti ad elevato rischio cardiovascolare"*. Riunione Annuale del Gruppo di Studio "Diabete e Aterosclerosi" della SID, Bologna, 22-23 Febbraio, 2013
- 29. M. Vitale**, M. Masulli, A.A. Turco, O. Ciano (a nome del Gruppo di Studio TOSCA.IT). *"Associazione tra il consumo di carboidrati ed il profilo lipidico in pazienti con diabete tipo 2"*. Congresso Nazionale della Società Italiana di Diabetologia (SID)

30. **M. Vitale** et al. *“Effetti di diete ricche in polifenoli e/o acidi grassi n-3 sul contenuto epatico di grasso in individui ad alto rischio cardiovascolare”*.  
Congresso Nazionale della Società Italiana di Diabetologia (SID)
31. **M. Vitale**, a nome del gruppo campano dello studio TOSCA.IT.  
*“Raccomandazioni nutrizionali per il diabete tipo 2: qual è il grado di adesione da parte dei pazienti?”*. Abstract e Poster accettato al XXIV Congresso Nazionale SID, Torino 23-26 Maggio 2012, pubblicato su Il Diabete – Supplemento I
32. M. Masulli, **M. Vitale**, a nome del gruppo campano dello studio TOSCA.IT.  
*“Abitudini alimentari dei pazienti con diabete tipo 2: ci sono differenze tra le diverse aree geografiche italiane?”* Comunicazione Orale accettata al XXIV Congresso Nazionale SID, Torino 23-26 Maggio 2012, pubblicato su Il Diabete – Supplemento I
33. L. Bozzetto, L. Costagliola, M. Giorgini, **M. Vitale**, G. Riccardi, A.A. Rivellese, G. Annuzzi. *“Conteggio del carico glicemico vs conteggio dei carboidrati in pazienti con diabete tipo 1: valutazione mediante monitoraggio continuo della glicemia”*.  
Abstract accettato al XXIV Congresso Nazionale SID, Torino 23-26 Maggio 2012, pubblicato su Il Diabete, Supplemento I